

ANALISIS DE CAMBIOS DE EXPRESION GENICA DURANTE MUERTE NEURONAL POR ESTRES OXIDATIVO



* 5 3 0 9 5 3 9 2 2 7 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

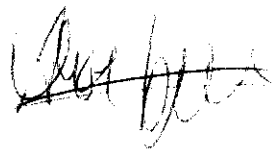
Memoria presentada por
ANA LOPEZ GUAJARDO
para optar al grado de
Doctor en Ciencias
por la
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
MADRID, 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

**ANALISIS DE CAMBIOS DE EXPRESION GENICA
DURANTE MUERTE NEURONAL POR ESTRSES
OXIDATIVO**

**Tesis presentada por
Dña. Ana López Guajardo
para optar al grado de
Dr. en Ciencias**



VºBº del Director



Fdo. Jose Ramón Naranjo Orovio

Madrid, 14 de Diciembre de 1995

El hombre se hizo siempre de todo material.....

S.Rodriguez

**A mis padres
y a mi abuela**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Jose Ramon Naranjo la dirección de esta tesis y por todo lo que con el he aprendido sobre el mundo de la ciencia.

A Britt Mellström le agradezco su constante supervisión y asesoramiento en las técnicas desarrolladas en el laboratorio. A Mariano Casado por los registros de las PC12 y por su inegable contribución a mi formación; también quiero agradecerle a mi tocaya Dopazo por todo lo que me ha ayudado con la hibridación substractiva y mucho más y a todos mis compañeros que han pasado del laboratorio B-01 (ex B-18), con especial mención para Isidro Donpablo Matador por su gran labor de apoyo.

Estoy muy agradecida a los becarios y personal que he conocido del Cajal y que me animaron para que esta tesis se entregara a tiempo por su generosa amistad (sí, Urbano a ti también).

Por último quiero agradecer a mi familia, Carolina y Zuli incluidas por aguantarme y como no a Freddy, Gocho y al Cubalibre como animales de compañía.

INDICE

INTRODUCCION

-NEUROTOXICIDAD-

-Excitotoxicidad:

- *Aminoácidos Neurotransmisores

- *Excitotoxicidad del glutamato

- *Implicación de los receptores de NMDA en la excitotoxicidad

-ESTRES OXIDATIVO-

OBJETIVOS

MATERIALES Y METODOS

RESULTADOS

-RECEPTORES ENDOGENOS FUNCIONALES DE NMDA EN CELULAS PC12-

- Expresión de subunidades del receptor de NMDA en líneas celulares

- Expresión de receptores de NMDA en células PC12 tras diferenciación con NGF

- Análisis por Western Blot de la proteína NMDAR1 presente en células PC12

- La toxicidad del glutamato en células PC12 no es mediada por

los receptores de NMDA

-CULTIVOS NEURONALES INMADUROS-

-Inducción de genes tempranos por glutamato extracelular en cultivos neuronales inmaduros

-Bloqueo de la traducción de c-fos por oligonucleótidos antisentido

-Inducción de cox-2 por glutamato

-Supresión de cox-2 con oligonucleótidos antisentido

DISCUSION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

NEUROTOXICIDAD

En el sistema nervioso la muerte o disfunción neuronal puede tener lugar en un amplio espectro de situaciones patológicas como, traumatismo cerebral, isquemia focal, enfermedades neurodegenerativas como la Corea de Huntington o la enfermedad de Alzheimer y procesos autoinmunes o infecciosos. Al margen de la diversidad de factores que pueden desencadenar daño neuronal actualmente es un consenso creciente el que los procesos de lesión en distintas patologías neuronales pueden converger en algunos mecanismos comunes como: excitotoxicidad mediada por receptores de glutamato, daño producido por ataque de radicales libres, y privación de factores tróficos. A pesar de haberse identificado estos mecanismos como factores comunes en el proceso de muerte neuronal, se desconoce la interrelación o secuencia temporal entre cada uno de estos mecanismos ni el peso específico de cada uno de ellos en la resultante muerte neuronal. Algunos ejemplos de esta discordancia entre un estímulo patológico y el proceso de muerte neuronal al que conduce se han descrito en episodios isquémicos o enfermedades neurodegenerativas. Durante el infarto cerebral focal, las neuronas en el centro de la región isquémica mueren rápidamente. Por el contrario neuronas más alejadas en la región de penumbra, continúan viables varias

horas despues(Siesjö, 1992). Un tipo similar de muerte neuronal retardada, aunque a más largo plazo, se observa en subpoblaciones neuronales específicas, en enfermedades neurodegenerativas, posiblemente tras una exposición anómala a aminoácidos excitatorios.

Las características morfológicas de la lesión neurotóxica *in vivo* (hinchamiento del soma y dendritas) son consistentes con una forma de muerte necrótica. Aun así en estudios recientes se han encontrado evidencias de que algunas subpoblaciones neuronales podrían morir por una vía apoptótica tras la activación de un programa de muerte celular endógeno (MacManus et al., 1993,1994). Necrosis y apoptosis son dos formas distintas de muerte celular con implicaciones muy diferentes para los tejidos próximos. La necrosis es un proceso pasivo de muerte celular, tipificado por hinchamiento de la célula y de los orgánulos con salida del contenido intracelular al medio extracelular. Este rápido proceso vendría desencadenado por una pérdida generalizada de la homeostasis celular que provoca un fallo energético y a menudo una sobrecarga descontrolada de Ca^{2+} . Como resultado normalmente se produce una reacción inflamatoria que conlleva la infiltración celular local, daño vascular, edema, lesión del tejido adyacente y eventualmente fibrosis. Por el contrario, la apoptosis se caracteriza por una contracción celular, relocalización y compactación de orgánulos, condensación de cromatina y formación de partículas rodeadas de membrana que contienen material intracelular que se conocen como "cuerpos apoptóticos". Para prevenir la salida de aminoácidos excitatorios, enzimas proteolíticas, ADN, y lípidos oxidados con pueden promover una respuesta

proinflamatoria, las células apoptóticas condensan su cromatina, se contraen y en algunos casos atrapan el medio intracelular mediante uniones covalentes en las proteínas de membrana. En las células apoptóticas las membranas internas y externa son preservadas de forma que el contenido celular queda sellado de forma segura dentro de la células moribundas hasta la intervención de la fagocitosis. *In vivo* normalmente las células apoptóticas que muestran modificaciones antigénicas son secuestradas por células fagocíticas. En procesos de muerte celular pueden coexistir células con características tanto necróticas como apoptóticas en los mecanismos de muerte. Se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* en modelos de sistemas apoptóticos que una necrosis secundaria puede tener lugar cuando se producen en un mismo momento un número inusualmente elevado de células apoptóticas. Mecanismos secundarios pueden estar mediando, en este caso, una desintegración celular similar a la necrosis, simplemente como reflejo de una insuficiente retirada por los fagocitos de células apoptóticas. Finalmente también existen datos sobre la inducción tanto de apoptosis como necrosis por un mismo tipo de agresión en varios tipos celulares, incluyendo neuronas (Bonfoco et al., 1995). Por ejemplo en cultivos corticales la formación de peroxinitrito a través de la reacción del NO^- con O_2^- produce apoptosis a bajos niveles pero aumentando la intensidad de la exposición se produce necrosis (Bonfoco et al., 1995).

La neurotoxicidad por tanto es un término muy amplio que se manifiesta de formas distintas según las características locales y fenotípicas de cada célula, donde parece haber una

interrelación estrecha entre acciones mediadas por aminoácidos excitatorios y fenómenos de estrés oxidativo.

La excitotoxicidad se ha definido dentro de la neurotoxicidad como la muerte neuronal consecuencia de una alta concentración extracelular de aminoácidos excitatorios.

EXCITOTOXICIDAD

Aminoácidos Excitatorios

El glutamato y aminoácidos acídicos relacionados han sido propuestos como los principales neurotransmisores en el sistema nervioso central de vertebrados. El proceso de transmisión sináptica requiere la interacción del glutamato con diversas proteínas, incluyendo receptores, sistemas de transporte, y enzimas. En el sistema nervioso central (SNC), la gran mayoría de las sinapsis excitatorias usan aminoácidos como sustancias neurotransmisoras. Los aminoácidos excitatorios, principalmente el glutamato (Glu), a través de los receptores que reconoce en la célula postsináptica no solo media la transmisión sináptica normal, sino que también participa en la maduración de las conexiones sinápticas y en el crecimiento y estructuración celular actuando en este punto como un auténtico factor trófico. Al margen de su función fisiológica se sabe que en determinadas circunstancias el glutamato podría actuar como una potente neurotoxina.

Los receptores glutamatérgicos en las vías excitatorias posibilitan la transducción de la información. Estos receptores tienen distintas propiedades farmacológicas y funcionales y podrían clasificarse en dos grandes familias. Una de ellas comprende los receptores que forman un canal iónico (receptores ionotrópicos), definidos por la acción depolarizante de agonistas selectivos: N-metil-D-aspartato (NMDA) y α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propionato (AMPA), el receptor el receptor de AMPA también puede ser activado por kainato. Se ha podido determinar que ambos receptores pueden coexistir en la misma sinápsis (Jones et al., 1991). Un nuevo tipo de receptor ionotrópico para el ácido glutámico es un receptor ionotrópico insensible a AMPA, que presenta desensibilización cuando se activa por kainato, quisqualato y glutamato. Este receptor ha sido descrito muy recientemente habiéndose denominado receptor "kainato-selectivo" (Lerma et al., 1993). La otra gran familia comprende receptores acoplados a proteína G, cuya activación provoca en unos casos la hidrólisis de fosfoinosítidos a IP₃ y diacilglicerol (Sladeczek et al., 1985) y en otros la modulación de los valores de cAMP (Tanabe et al., 1992). Son los receptores de quisqualato tipo B o de ACPD (receptores metabotrópicos). Esta familia incluye lo que parece ser un autoreceptor de efecto inhibidor presináptico, el receptor de AP₄, del que se dispone de limitada información (Forsythe et al.). Es un tema en continua evolución y esta clasificación puede verse alterada a medida que el conocimiento sobre los receptores nativos progrese, teniendo en cuenta las nociones

aportadas en los últimos años por el estudio de los diferentes tipos de receptores recombinantes.

El glutamato es un metabolito común de la célula. En el SNC estudios de ligación se han descrito lugares de unión para glutamato, con cinéticas de ligación anómalas que no son representativas de receptores excitatorios. Los sistemas de transporte representan una contribución a este sistema. Entre las proteínas que interactúan con el glutamato se han identificado varios sistemas de transporte. La retirada de glutamato extracelular por neuronas o células gliales ayudaría a la terminación de la acción del neurotransmisor. Se desconoce si la retirada del glutamato liberado en la sinapsis ocurre en mayor medida a través de la neurona presináptica o por la difusión hacia el exterior de la hendidura sináptica siguiendo el gradiente de concentración mantenido a partir de la entrada en células gliales. Administrando glutamato radioactivo en el cerebro, se observa que la mayor parte es acumulado en células de glia (McLennan, 1976). Aun así aunque las neuronas acumulen menor cantidad de glutamato que la glia, un transportador en la membrana presináptica tendría una localización ideal para la retirada de glutamato después de que este haya ejercido su acción postsináptica. Por otro lado el ciclo de la glutamina se ha propuesto como un mecanismo para mantener los niveles neuronales de glutamato frente a la pérdida continua que supone la liberación del neurotransmisor. Según este ciclo, el glutamato liberado por las neuronas como transmisor es acumulado por la glia y convertido en glutamina. La glutamina es entonces devuelta a las neuronas donde puede ser empleada como sustrato para una nueva síntesis de neurotransmisor. En

la membrana plasmática de las células del sistema nervioso se han descrito dos sistemas mediadores de la entrada de glutamato del espacio extra celular: un sistema Na^+ -dependiente y otro Na^+ -independiente. Los transportadores dependientes de Na^+ presentes en la membrana presináptica y en la glía tienen una alta afinidad por L-glutamato ($2\text{--}50\ \mu\text{M}$), pero transportan también D- o L-aspartato. La acumulación de glutamato en el interior celular en contra del gradiente de concentración ($\sim 10\ \mu\text{M}$ fuera hasta el rango 10mM en el interior celular) está acoplado al movimiento de iones de Na^+ a favor de su gradiente electroquímico transmembrana. Se ha postulado, que por cada anión de glutamato transportado al interior celular se cotransportan tres iones Na^+ (o dos Na^+ y un H^+), y un ion K^+ se transporta al exterior. El aumento de la concentración de K^+ extracelular y la depolarización de la membrana inhiben este tipo de transporte.

La entrada de glutamato Na^+ -independiente parece estar mediada por un sistema semejante al sistema x_c^- . Este sistema de transporte de aminoácidos aniónicos Na^+ -independiente fue descrito por primera vez en fibroblastos humanos (Bannai et al., 1980). Es un intercambiador de aminoácidos aniónicos con especificidad para cistina y glutamato, de entre los aminoácidos naturales presentes en los fluidos intra y extracelular. La cistina es transportada en su forma aniónica en este sistema. El sistema presenta una competitividad mutua en la entrada de los dos substratos. Se ha demostrado que la entrada de L-cistina es potentemente inhibida por L-glutamato y vice versa. La inhibición es inmediata y reversible, los estudios cinéticos además indican que se trata

de una inhibición competitiva. Los valores de K_m para la entrada de L-cistina y L-glutamato eran similares a sus valores de K_i cuando actúan como inhibidores (Bannai et al., 1980). La inhibición de la entrada de glutamato por cistina ocurre de una forma pH-dependiente; la inhibición aumenta con el aumento de pH. De acuerdo con los valores de pK de estos aminoácidos estos datos sugieren que la cistina es transportada específicamente por este sistema cuando presenta un grupo cargado positivamente y dos grupos negativamente cargados, que es la misma forma iónica en la que se encontraría el glutamato en el rango de pH estudiado (Bannai y Kitamura, 1980). La forma reducida de cistina, la cisteína es inestable en el medio extracelular y se oxida rápidamente a cistina por lo que las células tienen que internalizar cistina y reducirla a cisteína para su uso intracelular, particularmente para la síntesis de glutatión. La cisteína es el precursor limitante en la síntesis de glutatión (GSH), y el aporte de cistina en las células del sistema nervioso depende de la captación de este aminoácido del espacio extracelular por lo que este cotransportador de alta afinidad para cistina puede ser de gran importancia para la viabilidad celular. El transporte de glutamato por este sistema puede ser bloqueado por quisqualato pero es insensible a aspartato.

Existe también un transportador vesicular de Glu responsable del empaquetamiento de glutamato en vesículas para su subsiguiente exocitosis. Este transportador es así mismo Na^+ -independiente y acumula aniones de glutamato conducidos por el potencial de membrana positivo interno generado por una ATPasa vesicular que bombea protones al interior de la vesícula. Este

transporte presenta baja afinidad por glutamato (mM) y no transporta aspartato.

La acción integrada de estos sistemas permite mantener a concentraciones iónicas fisiológicas de los mamíferos, un gradiente de concentración de glutamato que va desde $10\mu\text{M}$ en el exterior celular a concentraciones del orden mM en el citoplasma y un orden de magnitud superiores ($\sim 100\text{ mM}$) en el interior de las vesículas.

Excitotoxicidad del glutamato

Los primeros experimentos en los que se demostró la potencial toxicidad del glutámico fueron realizados en 1957 por Lucas y Newhouse que descubrieron la inducción de la degeneración de las neuronas de la retina tras la administración sistémica de altas dosis de glutamato en ratones. Durante la década de los años 70 fueron de gran importancia los detallados estudios histológicos de Olney y sus colaboradores en los que la administración sistémica de glutamato en animales inmaduros induce la degeneración de neuronas de áreas no protegidas por la barrera hematoencefálica, especialmente el núcleo arcuato y el hipotálamo. Este compuesto producía una citopatología característica en la que se observó la destrucción de estructuras postsinápticas (dendritas y soma) mientras los axones, terminales presinápticas y células no neuronales sobrevivieron. Este mismo patrón en el daño celular se evidenciaba con la administración de análogos de glutámico por inyecciones locales en diferentes regiones cerebrales de

animales adultos. Estudios de estructura-actividad revelaron la existencia de una fuerte correlación entre la potencia neurotóxica y la potencia excitadora de distintos análogos de aminoácidos que sugería una convergencia entre los mecanismos subyacentes a estas dos acciones. En este punto se introdujo el término "excitotoxicidad" para hacer referencia a la habilidad del glutamato y otros aminoácidos estructuralmente relacionados para perturbar neuronas. La hipótesis de que la toxicidad de aminoácidos excitatorios en algunos casos podría ser consecuencia de una excesiva activación de los receptores de aminoácidos excitatorios y la noción de que esta toxicidad contribuye a la degeneración de células cerebrales que tiene lugar en algunas situaciones patológicas agudas, pudo ser examinada a partir del desarrollo de antagonistas selectivos que tuvo lugar a partir de 1980 y que facilitó la identificación de los aminoácidos excitatorios del SNC.

Implicacion de los receptores de NMDA en excitotoxicidad

El fenómeno de la excitotoxicidad comprende la muerte neuronal inducida por superactivación de receptores para aminoácidos excitatorios (AAEs).

El grado de implicación de los distintos receptores para aminoácidos excitatorios (AAEs) en el fenómeno neurodegenerativo *in vivo* no está delimitado, ahora bien, se ha propuesto el receptor para NMDA como el que parecería mediar en mayor medida los efectos neurodegenerativos de los AAEs.

El receptor para NMDA está asociado a un canal iónico de alta conductancia que es permeable a los cationes sodio, potasio y calcio y que presenta dependencia del voltaje. Asociado al canal hay una unidad de reconocimiento de fenciclidina (PCP) cuya activación, uso-dependiente, impide el flujo iónico por el canal. Además, existen un sitio de regulación alostérica positiva para glicina y otro de regulación alostérica negativa para el catión zinc. Por otra parte, los iones magnesio pueden ejercer un bloqueo dependiente de voltaje sobre el canal iónico asociado al receptor, de tal forma que para potenciales de membrana hiperpolarizados o próximos al nivel de reposo la acción del magnesio es máxima, en tanto que para valores depolarizados del potencial de membrana aparece un gradual desbloqueo del canal. Por último, otro sitio de regulación del canal iónico asociado al receptor de NMDA es el lugar de

fijación de poliaminas cuyo ligando endogeno serian moléculas del tipo espermina y espermidina.

Desde el punto de vista molecular, los receptores de NMDA son estructuras heteroméricas constituidas por ensamblaje de subunidades tipo 1 y tipo 2. Las subunidades tipo 1 derivan de un único gen, NMDA-R1, el cual por procesamiento alternativo de tres intrones/exones presentes en el transcrito heteronuclear puede dar lugar a ocho variantes potenciales. De las ocho posibles, siete han sido descritas en cerebro de rata y sus características funcionales, una vez analizadas individualmente muestran ser dispares. En cuanto a las subunidades tipo 2, se conocen cuatro que estan codificadas por cuatro genes independientes: NMDA-2A, 2B, 2C y 2D. Las subunidades tipo 2 son incapaces de formar canales funcionales *per se*, debiendose asociar con subunidades tipo 1.

Estudios en cultivos primarios de neuronas han permitido establecer que la apertura del canal de NMDA supone una subida de calcio libre que desencadena cambios a nivel de la expresión génica, a corto y medio plazo, que podrian ser determinantes en el fenómeno de excitotoxicidad y que preceden a la muerte de la neurona. Dadas las propiedades de permeación para los iones calcio del canal asociado al receptor de NMDA, se ha propuesto a este como el que pareceria mediar en mayor medida lo efectos neurodegenerativos de los aminoácidos excitatorios.

Durante la ultima decada, se han acumulado considerables evidencias circunstanciales que implican la sobre estimulacion de los canales iónicos activados por glutamato como el detonante de degeneración neuronal en modelos experimentales de patologias como epilepsia, isquemia, e hipoglicemia (Choi,1988; Meldrum,1993). Hasta la fecha no esta claro hasta que punto podria ser la excitotoxicidad la unica responsable de la degeneración neuronal tardia y progresiva que aparece en algunas patologias en las que se ha implicado el glutamato.

ESTRES OXIDATIVO

La vulnerabilidad selectiva de determinados sistemas neuronales es una característca destacable de las enfermedades degenerativas en el cerebro como la Enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, y esclerosis amiotrófica lateral. Existe dificultad en establecer la relacion que puede existir entre la acción neurotóxica del glutamato y las enfermedades neorodegenerativas debido al desacoplamiento entre la dinámica en el orden de los milisegundos de los canales ionicos operados por glutamato y los años que implica el proceso de perdida neuronal gradual en estas enfermedades.

Otra linea de investigacion ha conducido a el papel que podria desenpenar el estres oxidativo como causa de algunas de estas enfermedades degenerativas.

Las reacciones de oxadación y reducción implican una transferencia de electrones y pueden, en ocasiones, generar

productos secundarios conocidos como radicales libres. Los radicales libres son átomos o moléculas que contienen un orbital con un electrón desapareado. Algunos radicales libres son altamente reactivos y son capaces de extraer electrones de moléculas vecinas para completar su orbital. La reducción molecular de oxígeno a agua en el transcurso de la fosforilación oxidativa implica la formación de radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot) conocidos colectivamente como radicales de oxígeno. Estas especies son generadas como subproductos de procesos metabólicos normales y aberrantes que utilizan oxígeno molecular (O_2).

El cerebro consume una cantidad desproporcionada del O_2 del cuerpo, y obtiene su energía exclusivamente a través del metabolismo oxidativo de la cadena respiratoria mitocondrial. Se encuentran mitocondrias en los cuerpos celulares pero también se encuentran distribuidas por los procesos neuríticos -dendritas, axones, y botones sinápticos- se mantienen los gradientes iónicos a través de la membrana mediante adenosintrifosfatasas (ATPasas). La oxidación fosforilativa mitocondrial, que genera adenosina trifosfato con la reducción de O_2 hasta H_2O a través de la adición secuencial de cuatro electrones y cuatro H^+ , varía en proporción con la actividad sináptica. La "fuga" de electrones de alta energía a lo largo de la cadena de transporte de electrones mitocondrial causa la formación de O_2^\cdot y H_2O_2 .

La actividad de algunas enzimas neuronales produce oxidantes. La activación Ca^{2+} -dependiente de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) libera ácido araquidónico (AA), el cual genera O_2^\cdot a través de

su subsiguiente metabolismo catalizado por lipoxigenasas y ciclooxigenasas para la formación de eicosanoides. La formación de óxido nítrico (NO), el segundo mensajero difundible, factor relajante derivado de endotelio, esta catalizada por la óxido nítrico sintetasa (NOS), una de cuyas formas se encuentra concentrada en determinadas neuronas. se activa por Ca^{2+} , y regulada por receptores de neurotransmisores. El óxido nítrico reacciona facilmente con O_2^- para dar el anión peroxinitrito, que se descompone a OH. En condiciones de deficit energético y elevado Ca^{2+} intracelular, la xantina deshidrogenasa es convertida a xantina oxidasa por proteasas dependientes de Ca^{2+} . La conversión de hipoxantina y xantina, por la xantina oxidasa a ácido úrico genera O_2^- . El radical hidroxilo (OH), la especie mas reactiva, no es generada directamente por ninguna reacción enzimática. Sin embargo H_2O_2 se descompone lentamente a OH, un proceso acelerado considerablemente en presencia de Fe^{2+} por la reacción de Fenton.

En paralelo con estas fuentes de oxidantes celulares existen en el cerebro mecanismos de defensa dedicados a reducir los niveles de oxidantes. El ácido ascórbico (vitamina C) es un antioxidante hidrofílico, mientras que α -tocoferol (vitamina E) es un antioxidante hidrofóbico que se concentra en membranas. Aunque el α -tocoferol puede reaccionar con oxígeno atómico y OH, la mayor acción antioxidante del α -tocoferol es debida a su habilidad para donar hidrógenos lábiles a radicales peroxi y alcoxi, impidiendo la peroxidación lipídica. Por esto el α -tocoferol ha sido clasificado como un antioxidante "rompedor de cadena" haciendo referencia a la

capacidad de interrumpir la cascada de reacciones oxidativas que pueden desencadenarse en la bicapa lipídica. El glutatión, un tripéptido sintetizado intracelularmente, en su estado reducido puede reaccionar de forma no enzimática tanto con oxígeno atómico como con $\text{OH}\cdot$.

La glutatión peroxidasa remueve H_2O_2 del espacio intracelular reduciéndolo a H_2O y O_2 . Es una enzima que se encuentra a altas concentraciones en el cerebro. Además de eliminar H_2O_2 , la glutatión peroxidasa participa en las vías responsables de la desintoxicación de radicales peroxi lipídicos. Finalmente, la quinona reductasa, un enzima citosólico, identificada por su papel protector contra carcinógenos, cataliza una reducción de dos electrones de las quinonas hacia hidrquinonas más estables y menos reactivas.

Los radicales de oxígeno pueden atacar proteínas, ácidos deoxinucléicos, y lípidos de membrana disrumpiendo las funciones y la integridad celular.

El cerebro contiene grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, que son particularmente vulnerables al ataque de radicales libres, ya que los dobles enlaces en el entorno de la bicapa exponen átomos de hidrógeno que son fácilmente atacables por especies reactivas de oxígeno como $\text{OH}\cdot$. El radical de carbono formado en los ácidos grasos poliinsaturados sufre una reorganización molecular para formar dienos conjugados más estables, que pueden formar enlaces covalentes con ácidos grasos contenidos en la membrana celular. En condiciones aerobias, la peroxidación lipídica continua al combinarse los dienos conjugados con el O_2 para formar radicales peroxi orgánicos adicionales. Los radicales

peroxi capturan hidrógenos de cadenas de ácidos grasos adyacentes, propogando de esta manera el proceso de peroxidación lipídica. Aun más los radicales peróxido pueden combinarse con un átomo de hidrógeno substraído para formar hidroperóxidos lipídicos, que en presencia de Fe^{2+} , se descomponen a radicales alcoxi y aldehidos. De esta manera un solo $\cdot\text{OH}$ puede iniciar una reacción en cadena que genera numerosos reactivos tóxicos, confiere rigidez a la membrana por a traves de la formación de enlaces covalentes entre las moléculas oxidadas, interrumpen la integridad de la membrana, y afectan a las proteínas de membrana.

En enfermedades neurodegenerativas el estres oxidativo podria dar cuenta de el daño acumulativo asociado a la aparición tardia y la naturaleza progresiva de estas enfermedades. La neurotoxica inducida por glutamato podria ser una fuente importante de estres oxidativo y estos dos mecanismos pueden actuar de una manera secuencial asi como sinérgica, conduciendo a una degeneración neuronal selectiva.

Los efectos mediados por Ca^{2+} de la activación de receptores de glutamato que conducen a degeneración neuronal pueden implicar un distintas vias que causan estres oxidativo. La estimulación de PLA_2 mediada por receptores de NMDA y la subsiguiente liberación de ácido araquidónico (AA) conduce a la generación de radicales de oxígeno. EL AA y los radicales de oxígeno aumentan la liberación de glutamato e inhiben su inactivación por retirada a traves de los procesos de transporte neuronal y glial. La elevación de Ca^{2+} intracelular activa peptidasas, como la calpaina I, la cual puede catalizar la conversión enzimática de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa; el

catabolismo de las bases púricas por la xantina oxidasa produce $\cdot\text{O}_2^-$. El aumento de ácido láctico en estas condiciones crea un entorno ácido que favorece la liberación del Fe^{2+} celular, lo que promovería la reacción de Fenton para producir $\cdot\text{OH}$ a partir de H_2O_2 .

Dawson y colaboradores propusieron que el óxido nítrico (NO) producido por la activación de la óxido nítrico sintetasa (NOS) por Ca^{2+} en determinadas neuronas causa la degeneración de neuronas vecinas. Demostraron la protección frente a este tipo de neurotoxicidad en cultivos celulares mediante el tratamiento con inhibidores de NOS o hemoglobina en estado reducido, la cual une NO; por eliminación de arginina, el sustrato para NOS, del medio de cultivo; o mediante la destrucción selectiva de neuronas que expresaban NOS por tratamiento previo con ácido quiscuálico al que son diferencialmente sensitivas. El óxido nítrico interfiere en procesos celulares vitales, como la oxidación fosforilativa mitocondrial y la ribonucleótido reductasa, el NO reacciona con $\cdot\text{O}_2^-$ para formar el anión peroxinitrito que se descompone a $\cdot\text{OH}$. Curiosamente las neuronas que expresan NOS son resistentes a la degeneración inducida por el óxido nítrico, lo cual es indicativo de que en estas células como ocurre en macrófagos que expresan NOS poseen algún tipo de factor protector.

Una forma bien caracterizada de neurotoxicidad inducida por glutamato que resulta de un estrés oxidativo no está mediada por canales iónicos operados por glutamato sino por el transportador x_c^- de cistina al que se une glutamato.

Utilizando la línea celular N18-RE-105, un hibridoma de

retina-glioma neuronal Murphy y colaboradores demostraron que Glu a una concentración elevada en el medio de cultivo producía la degeneración de estas células similares a neuronas después de aproximadamente 8 horas de exposición continua. Aunque la citotoxicidad era dependiente de Ca^{2+} en el medio, por registros intracelulares desvelaron que Glu producía únicamente una modesta depolarización (+5 mV), que era inconsistente con la activación de canales operados por Glu. La potencia citotóxica del Glu se correlacionaba inversamente con la concentración de cistina en el medio de cultivo. La privación de cistina resultante causa una disminución progresiva del glutathión celular; que con el transcurso del tiempo desemboca en la acumulación intracelular de oxidantes y la muerte de la célula por estrés oxidativo. Neuronas de corteza inmaduras en cultivo degeneran como consecuencia de la inhibición por Glu del transporte de cisteína, antes de expresar niveles sustanciales de canales iónicos operados por Glu (Murphy et al., 1990). La fuerte dependencia de las neuronas de tomar cistina del medio para su viabilidad podría ser un mecanismo adicional de degeneración neuronal mediado por glutamato. Las neuronas fetales podrían ser especialmente sensibles a esta forma de excitotoxicidad por su elevada actividad metabólica asociada al desarrollo neuronal. El desarrollo incompleto de la barrera hematoencefálica podría exponer a las neuronas fetales a las altas concentraciones de glutamato que se encuentran normalmente en el plasma. El tejido fetal carece además de la enzima cistationasa que sintetiza cistina a partir de metionina.

El estrés oxidativo ha sido implicado en como una vía común en un amplio espectro de fenómenos citotóxicos. La inducción de estrés oxidativo por glutamato puede ser el responsable de distintas formas de neurodegeneración. Notablemente, la concentración extracelular de cistina medida en estudios de fluido cerebrospinal de mamíferos adultos, en aproximadamente $1\text{ }\mu\text{M}$ (Perry et al., 1975), mientras la concentración intracelular de glutamato sobrepasa 3 mM . Agresiones estructurales o metabólicas que conlleven secuestro de glutamato, especialmente en el desarrollo temprano antes de la expresión de receptores de glutamato unidos a canales iónicos, podrían resultar en deficiencias de transporte de cistina, estrés oxidativo, y degeneración neuronal. Este mecanismo podría ser el principal responsable también de la degeneración neuronal en ciertas enfermedades metabólicas congénitas que afectan la disposición de cistina, como ocurre en homocistinuria en la que existe una deficiencia en cistationin sintetasa. Oka y colaboradores han demostrado una en oligodendroglia inmadura una vulnerabilidad semejante. Sus experimentos llevados a cabo en medio libre de cistina indicaron que concentraciones extracelulares elevadas de Glu estimulaba la salida de cistina de las células en un proceso mediado por transportador, que resulta en la depleción de glutatión. Postularon que este mecanismo podría ser el responsable de la leukomalacia periventricular en prematuros, donde tras isquemia se produce una degeneración extensiva y selectiva de oligodendroglia, que altera la formación de sustancia blanca subsiguiente.

OBJETIVOS

Nuestro grupo está interesado en los mecanismos moleculares que tienen lugar en los procesos de muerte neuronal y la posible elucidación de una vía genética común subyacente en estos procesos. En este sentido están siendo objeto de estudio en nuestro grupo distintos modelos tanto *in vivo* como *in vitro* en los que se ha descrito la ocurrencia de neurotoxicidad en respuesta a distintas agresiones. Previamente se habían utilizado en nuestro laboratorio cultivos de corteza e hipocampo maduros, cuatro horas después de un pulso de NMDA para el aislamiento de genes cuya respuesta resultara aumentada o inducida en respuesta a este agonista específico de los receptores de glutamato que se habían descrito como mediadores de excitotoxicidad.

No obstante la complejidad de este sistema hacía difícil el seguimiento de una ruta principal de mecanismos moleculares conducente a la muerte de las células nerviosas, la caracterización de la implicación funcional de cada uno de los genes de inducción caracterizados debido al solapamiento de distintas rutas activadas por un mismo precursor. Hasta el momento no se ha podido determinar en qué medida esta contribuyendo únicamente la excitación a través de receptores en la degeneración neuronal progresiva y retardada que se observa en algunas patologías en las que está implicado el

glutamato. Para abordar la caracterización aislada de alguna de las vías implicadas en la neurotoxicidad, intentamos encontrar un modelo homogéneo o fenotípicamente definido en el que ocurriera la muerte neuronal de forma reproducible. Dentro de este contexto intentamos abarcar dos vías independientes en la potencial neurotoxicidad del glutamato con la siguiente aproximación

- Busqueda de líneas celulares que expresaran el receptor ionotrópico para glutamato denominado NMDA que se había descrito como mediador de procesos excitotóxicos.

- Caracterización molecular y funcional de los receptores expresados en la línea celular PC12.

- Estudio de la potencial mediación excitotóxica de estos receptores.

- Caracterización de un efecto neurotóxico alternativo del glutamato, en cultivos inmaduros, por estrés oxidativo.

- Estudio de los mecanismos moleculares implicados en este proceso de estrés oxidativo a partir del análisis de la expresión génica, tras la estimulación con glutamato.

MATERIALES Y METODOS

CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS

Para el cultivo de neuronas de corteza cerebral e hipocampo se utilizaron embriones de rata en el día 17 embrionario. Las ratas gestantes, de la cepa Wistar, fueron suministradas por el animalario del Instituto Cajal. Una vez extraídos los fetos, se diseccionaron las estructuras correspondientes y fueron liberadas de meninges. Los fragmentos de tejido se incubaron a continuación con tripsina (10 ug/ml) a 37°C durante 15 minutos. La disociación mecánica del tejido se realizó en una solución isosmótica que contenía albumina de suero bovino 3 mg/ml, 0,36 mg/ml de inhibidor de tripsina y 56 ug/ml de DNasa. Tras sedimentar las células se resuspendieron en BME (Whittaker) suplementado con 10 % de suero fetal de ternera, glutamina 2 mM y gentamicina 100 ug/ml. Las células se sembraron en placas de cultivo de plástico (Nunc) tratadas con poli-L-Lisina (Sigma Pm 62.000, 10 ug/ml). Los cultivos se incubaron a 37°C al 5 % de Co².

TINCION VITAL

La muerte celular fue evaluada utilizando acetato de fluoresceína (FA) y el agente intercalante ioduro de propidio (PI) como describieron Abele y colaboradores (1990). El medio de cultivo fue sustituido por una solución en tampón fosfato salino de 20 ug/ml FA y 0.5 ug/ml de PI. Inmediatamente se cuantificó mediante conteo la proporción de células vivas capaces de metabolizar el FA frente a las células muertas que permiten el paso de PI a través de su membrana. Se contaron 10 campos en cada placa y la tinción se realizó por duplicado para cada punto en los distintos experimentos.

CULTIVO DE LA LINEA CELULAR PC12

Las células PC12 fueron crecidas de forma continua en la modificación Dubelco del medio Eagle (DMEM) suplementado con 6 % de suero de caballo y 6 % de suero fetal de ternera, inactivados por calor y mantenidas en un incubador humidificado a 37° C y 10 % CO₂. Para la diferenciación las células PC12 se plaquearon en placas Petri de 35 mm tratadas con poli-D-lisina y se trataron con 100 ng/ml NGF durante 5 días.

EXTRACCION DE ARN

Las células fueron lisadas en una solución de tiocianato de guanidina 5 M, Tris-ClH 100 mM (pH 7,4), EDTA 10 mM y B-mercaptoetanol al 5 %. El lisado se transfirió a un tubo con un lecho de CsCl 5,7 M y citrato sódico 25 mM (pH 7) y se centrifugó durante 16-20 hrs. a 34.000 rpm en un rotor SW60, en una ultracentrifuga Beckman L-8.

En los casos que fue necesario se separó el ARN poliadenilado de los otros ARNs nopoliadenilados. El método empleado fue la cromatografía en oligo(dT)-celulosa preparado según describe Gilham (1964). La oligo(dT)-celulosa utilizada fue comprada a Biolabs (New England).

ANALISIS DE ARN POR NORTHERN BLOT.

El ARN total fue separado electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.1 %, formaldehído 2,2 M y transferido a una membrana de nitrocelulosa (Schlischer & Schuell). Se marcaron sondas específicas de cDNA de *c-fos* (Sassone-Corsi et al., 1988), *c-jun*, *mif* y β -actina con P^{32} -dCTP con un método de marcage por "random primer" (Pharmacia) con una actividad específica mayor o igual a 7×10^8 cpm/ μ g. Para las subunidades NMDAR1 y NMDAR2C, del receptor de NMDA, se cortaron los fragmentos 1-347 y 1-229 de regiones de baja homología de los pÁsmidos pN60 (Moriyoshi et al., 1991) y pNR2C (Ishii et

al.,1993) respectivamente. La sonda de cox-2 se marcó a partir de el fragmento amplificado por PCR, correspondiente a la posición 380-1224 en el cDNA de rata (Kanato Yamagata et al.,1993). La hibridación se realizó en una solución de formamida al 40 %, SSC x 4, SDS al 0.08 %, 80 ug/ml de DNA desnaturalizado de salmon, solución Denhart x 2 y sulfato de dextrano al 10 % durante toda la noche a 42°C . Los lavados se hicieron en SSC x 2, SDS al 0.1 % a 42 C primero y en SSC x 0.1, SDS al 0.1 % a 65 despues. La exposición autorradiográfica se realizó con película Kodak X-Omat y pantallas intensificadoras a -80°C. La estimación de los niveles de ARNm se hizo midiendo la densidad óptica de los autorradiogramas con un densitómetro asociado a un programa de análisis (Molecular Dynamics).

EXTARACCION DE PROTEINAS

Los extractos de proteína se obtuvieron a partir de las células en cultivo mediante la homogenización y la solubilización en un tampón de lisis (20 mM Tris-HCl; pH 7.5, sacarosa 0.32 M, 0.2 mM EDTA, 0.5mM EGTA, 2 mM PMSF y leupeptina 10 ug/ml). El lisado se centrifugó a 50.000 rpm durante 30 minutos para eliminar los restos celulares. El precipitado obtenido que contenia las membranas celulares se resuspendió en 100 ul de tampón GTED (glicerol al 20 %, 10 mM

Tris-HCl; pH 7.5, EDTA 1 mM, 1 mM DTT). La cantidad de proteína se midió por el método de Bradford. Se solubilizaron 50 ug de proteína de membrana en tampón de muestra SDS que contenía un 5 % de 2-mercaptoetanol. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel de SDS-poliacrilamida al 6 %. Se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos (Sigma) para determinar el peso molecular de las bandas. Las proteínas fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa mediante electrotransferencia semiseca. Los filtros se bloquearon en una solución al 3 % de leche en polvo desnatada e incubados posteriormente durante 14-16 horas a 4°C con el anticuerpo comercial purificado por afinidad anti-NMDAR1 mAb 54.1 (Pharmigen; dilución 1:1000). Los lavados se hicieron con TBS-Tween 0.3%. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas utilizando un anticuerpo conjugado con peroxidasa de nabo usando un sustrato quimioluminiscente (ECL, Amersham).

ANALISIS POR RT PCR

Se retrotranscribió 1 ug de ARN total utilizando la transcriptasa inversa del virus de mieloblastosis murina (BRL) con hexámeros random (2.5 uM) como primers en una reacción de 20 ul que contenía 10 mM Tris-HCl; pH 8.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM ditioneitol, 1 mM de cada dNTP y 20 U de Inhibidor de RNAsas (Promega). Después de una incubación a 42°C durante 45 min. se inactivó la enzima calentando a 99°C, 5 min.

Para la reacción de amplificación por PCR, se incubó el cADN obtenido con parejas de oligonucleótidos primer específicos a una concentración de 0.5 uM cada uno y 2.5 U de polimerasa Taq (Promega) en un volumen final de reacción de 100 ul, después de ajustar a 2 mM la concentración de Mg^{2+} . Los parámetros de los ciclos fueron 1 min. a 94°C, 1 min. a 60 °C y 2 min. a 72°C durante 35 ciclos seguidos por 10 min. finales a 72°C.

En las RT-PCR para las células PC12, de cada reacción se resolvieron 10 µl en un gel de agarosa al 2 % que fue transferido a un filtro de nitrocelulosa. El filtro se hibridó utilizando como sonda radioactiva cADN del plásmido pN60 marcado con P^{32} . Los primers utilizados (las posiciones en la secuencia de cADN publicada por Moriyoshi et al. 1991, se muestran en paréntesis) fueron los siguientes:

para la inserción en el N-terminal (primers 1/2):

primer 5' 5'-CCACTTCACTCCCACCCCTGTCTCC-3' (565-589)

primer 3' 5'-GCAGAGCCGTCACATTCTTGTTCC-3' (863-887)

para las deleciones del C-terminal (primers 3/4):

5' primer 5'-TCTTCCGCTCAGGCTTTGGCATCG-3' (2523-2546)

3' primer 5'-CCGAGCAGCAGGACTCATCAGTGT-3' (3434-3457)

primers 5/6:

primer 5' 5'-GAGCCCGACCCTAAAAAGAAAGCC-3' (2876-2899)

primer 3' 5'-CGGCAGCACTGTGTCTTTTGGTT-3' (2996-3019)

primers cox-2

primer 5' 5'-AACATTGTGAACAACATTCCCTTCCTTC-3' (380-408)

primer 3' 5'-CGGATGCCAGTGATAGAGTGTCTTGA-3' (1224-1250)

Primers NMDAR2A-C:

primer 5' 5'-TGCCACAACGAGAAGGGTGAGTGATGAGTAGCCAGCTGGCAT-3'

primer 3'NMDAR2A 5'-AGGGGCATCTATAGTTGCATCCATGGGGTACACATTGAAG-3'

" NMADA2B 5'-

AAAACCTGTTTCAGTGACTACATTAGCGAGTAGAGAGAGAACATTT-3'

primer 3'NMDAR2C 5'-

ATCGAGAACTGGGGCAACAACCGCCGCGTGCCTGCTCCCACCGCCTCTGG-3'

RT-PCR Semicuantitativo

Para cuantificar la cantidad de ARNm de las distintas muestras iniciales se utilizó como control de standard interno el gen de la β -Actina de expresión constitutiva. Utilizando oligonucleótidos primer específicos para los distintos ARNm de interes y la β -Actina en reacciones paralelas se extrajeron muestras de 10 μ l de la mezcla de reacción a distintos tiempos del proceso de amplificación antes de alcanzarse la saturación. Para los ARNs poco abundantes se comenzó el muestreo apartir de 20 ciclos y para β -Actina a partir de 10 ciclos, tomando muestras cada 5 ciclos.

El uso de oligonucleótidos primer de β -Actina como transcrito control permite asi mismo comprobar que cada muestra ha sido retrotranscrita a cDNA de forma equivalente y la amplificación en el PCR ha sido tambien equivalente.

Los productos de cada reacción se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio.

BLOQUEO DE LA TRADUCCION DE C-FOS Y COX-2 CON OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO

Los oligonucleótidos 5'-ACCCGAGAACATCAT-3' y 5'-GCTCGGAAGAGCATC-3', de secuencia complementaria a los codones 1 a 5 de las proteínas c-Fos y Cox-2 de rata respectivamente, (asi como su complementario) fueron añadidos al medio de cultivo a una concentración final de 40 μ M.

Para los experimentos de bloqueo de la expresión de *cox-2* se sintetizó como control adicional un oligonucleotido antisentido mutado que presentaba la misma composición de bases en una secuencia al azar. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por el Servicio de Macromoléculas del Instituto Cajal.

HIBRIDACION SUBTRACTIVA

Construcción de genotecas direccionales de cDNA

Las genotecas de cDNA direccionales a partir de mRNA de cultivos control y tratados con glutamato se contruyeron de la siguiente manera: los cDNAs de células control y tratadas se

construyeron a partir del ARN enriquecido en poli-A empleando el kit comercial TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De forma esquemática el cDNA de doble cadena se sintetizó por el método Gubler-Hoffman utilizando un primer NotI-oligo(dT), unido a un linker EcoRI, digerido con NotI y clonado en un vector de fago. La genoteca direccional de cDNA de los cultivos tratados fue construida en pT7T3D18UNot/EcoRI/BAP(Pharmacia) y fue la empleada como "target". En la construcción de la genoteca de cDNA direccional de las células control se utilizó un segundo vector, pGEMIIzf(-) (Promega) y con ella se preparó el "driver". En ambos casos se sometieron los vectores a una doble digestión con las endonucleasas de restricción NotI y EcoRI y se defosforilaron los extremos de las dianas de restricción con fosfatasa alcalina de intestina de ternera (Boehringer Mannheim).

Cada preparación de cDNA-vector fue transfectada en la cepa MC1061 de bacterias competentes, por electroporación y sembradas en placaBs de agar con ampicilina. Basado en el número de colonias resistentes a ampicilina, se estimó en aproximadamente 10^6 el número de recombinantes para cada librería. DNA de fago se preparó de cada genoteca direccional mediante lisis alcalina estandar seguida de purificación por centrifugación de equilibrio en gradiente de CsCl-bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989)

Hibridación Substractiva

El cDNA "target" se preparó por el siguiente procedimiento.

La genoteca direccional de cDNA de las células tratadas, en el vector pT7T3D se linearizó por digestión con NotI. Se obtuvo cARN de la hebra sentido por síntesis *in vitro* con T7 ARN polimerasa empleando un kit para transcripción de ARN (Stratagen). A continuación se sintetizó cDNA antisens con la transcriptasa inversa M-MLV (Gibco) a partir de 1 μ g de del cRNA utilizando el primer NotI-oligo(dT) (Pharmacia). Se incluyó una pequeña cantidad de P³²-dCTP en la reacción para la posterior cuantificación del cDNA "target" después de la substracción. El producto fue tratado con alcali para hidrolizar el ARN molde, y el cDNA antisens resultante se utilizó como el "target" en la hibridación subtractiva. El "driver para la substracción se preparó de la siguiente manera. La gB12 0 noteca direccional de cDNA control se linearizó con la enzima HindIII y cRNA sentido del control se transcribió con ARN polimerasa T7 y se eliminó el ADN molde con DNasa libre de RNasas.

El cDNA "target" antisentido marcado radioactivamente se mezcló con 20 μ g de cRNA sentido del control en 10 μ l de buffer de hibridación (NaCl 0.5M, HEPES (pH7.6) 50mM, EDTA 2mM, y 0.2% SDS). La hibridación se llevo a cabo en un capilar de vidrio sellado a la llama que se hirvió durante 90 segundos y se incubó a 68 °C durante 24 horas. Después de la incubación la muestra fue extraída con fenol-cloroformo , precipitada con etanol y resuspendida en 500 μ l de un buffer fosfato 50 mM(PB), pH6.6, con 0.2% SDS. La muestra fue entonces cargada en en una columna "de camisa"???, que contenía 1 ml de hidroxiapatito(DNAGrade Bio-Gel,Bio-Rad) mantenida a 60 °C , que había sido equilibrada con 50 mM PB/0.2% SDS. Después de

lavar la columna con 6 ml de 50 mM PB/0.2% SDS, se eluyó el cDNA monocatenario con 6 ml de PB 120 mM con 0.2% SDS, y el cDNA hibridado con ARN driver se eluyó con 6 ml de PB 400 mM/0.2% SDS. El cDNA "target" monocatenario se concentró y desaló con un filtro Centricon-30, se precipitó con etanol y se incubó de nuevo con 20 µg del ARN "driver" en una segunda ronda de substracción. El cDNA "target" monocatenario eluido en la fracción PB 120 mM de la segunda columna de hidroxipatito se utilizó como molde para PCR.

Para la amplificación por PCR se utilizaron los primers complementarios a las secuencias en los extremos de inserción del vector diseñados a tal efecto.

Para la construcción de la genoteca células tratadas menos control el producto amplificado del cDNA se digirió con NotI y EcoRI que tiene dianas en los extremos y se ligó en PT7T3DEcoRI/NotI/BAP.

"Screening" diferencial de la genoteca substraída

Una alícuota de la genoteca substraída de cDNA fue transfectada en células competentes y se pincharon los transfectantes individualmente en membranas de nylon, de las que se hicieron replicas. Cada membrana se hibridó con una sonda de cDNA control, de cDNA de cultivos tratados substraído y no substraído. Cada filtro se hibridó con un mismo número de cuentas radioactivas para cada sonda.

RESULTADOS

RECEPTORES ENDOGENOS FUNCIONALES DE NMDA EN CELULAS PC12

Expresión de subunidades del receptor de NMDA en líneas celulares

Dada la complejidad molecular de los mecanismos que determinan la muerte o viabilidad celular después de un pulso de NMDA, el análisis funcional de los posibles genes de inducción solo tendría sentido en un contexto de cambio global de la expresión genica. Para ello, tratamos de localizar en líneas celulares existentes con receptores de NMDA funcionales en su membrana y que puedan servir de modelo.

En este sentido se ha descrito que diferenciación neuronal de teratocarcinomas de ratón (línea celular P19) o humanos (línea celular NT2) mediante administración de ácido retinoico y co-cultivo con células gliales, supone la expresión de novo de receptores funcionales para NMDA, cuya estimulación determina entrada de calcio y eventualmente muerte de la neurona. Ambos sistemas podrían ser interesantes para nuestros fines, sin embargo el requerimiento de co-cultivo con glia (P19) o el largo tiempo necesario para conseguir la diferenciación (NT2) justifican la búsqueda de otros sistemas alternativos.

Se identificaron varias líneas celulares establecidas que expresaban ARNm por el análisis de Northern blot (fig.1,A) así como la coexpresión en estas líneas de subunidades de tipo 2

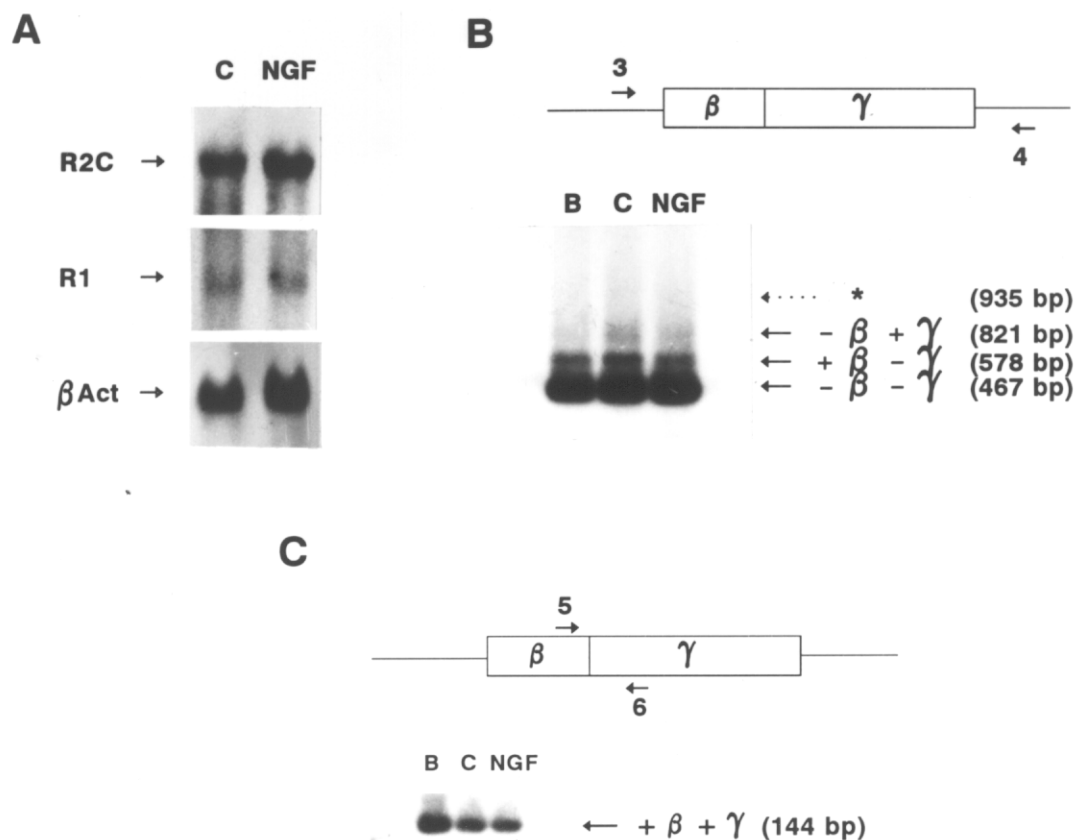


Figura 2. Expresión de subunidades del receptor de NMDA en células PC12

A, Análisis por Northern Blot del ARN total de células PC12 control (C) y tratadas con NGF (N). La carga de cada calle se normalizó mediante la hibridación de con β -Actina (β -Act). B y C, RT-PCR de las variantes de splicing de NMDAR1 en células PC12 control (C) y diferenciadas (N). ARN total de cerebro de rata (B) se incluyó como control positivo. *Migración de la isoforma + β + γ que no se amplificaba con los primers 3 y 4. La identidad de las bandas amplificadas se confirmó por hibridación en Southern Blot con una sonda radioactiva de NMDAR1.

que darian lugar al potencial ensamblaje de receptores funcionales en la membrana celular. El analisis de la presencia de transcritos para subunidades tipo dos se llevo a cabo por RT-PCR con primers especificos para los distintos subtipos (fig.1,B). Estos experimentos revelaron la coexpresión de transcritos para NMDAR1 y NMDAR2C en la linea celular PC12.

Las células clonales de feocromocitoma de rata PC12, derivan de células cromafines medulares. En presencia de factor de crecimiento nervioso (NGF) las células PC12 intrrumen su ciclo mitótico y se diferencian tanto morfológica como bioquímicamente a células nerviosas (Green y Tischler,1982). Se han documentado un conjunto diverso de cambios electrofisiológicos y bioquímicos acompanando la diferenciación inducida por NGF. Entre los primeros, las células PC12 se convierten eléctricamente excitables y responden a acetilcolina a traves de receptores nicotínicos tipo neuronal. Los cambio bioquímicos implican tanto acciones inducidas por NGF dependientes de transcripción como independientes de transcripción.

Expresión de receptores de NMDA en células PC12 trasdiferenciación con NGF

Se paso a estudiar entonces la evolución y la funcionalidad de los receptores cuya expresion habia sido detectadas en esta linea celular de PC12 en particular, tras la diferenciación inducida por el factor de crecimiento nervioso (NGF).

Para caracterizar estos receptores se llevaron a cabo experimentos utilizando las técnicas de amplificación por PCR, Western blots y análisis de parche-escindido en células PC12 indiferenciadas y diferenciadas con NGF.

Utilizando el análisis por Northern blot de ARN total extraído de células PC12 control y tratadas con NGF, se observaron altos niveles de expresión del gen NMDAR1 en las células PC12 no tratadas (fig. 2), ver también Schubert et al. 1992, and Sucher et al., 1993). La diferenciación neuronal por adición de NGF a las células PC12 no producía un cambio en los niveles de ARNm de NMDAR1. Estos mismos blots una vez lavados se hibridaron una sonda específica para la subunidad tipo 2C del receptor de NMDA. Las células PC12 mostraron la expresión del gen NMDAR2C sin cambios en los niveles de transcritos después de la adición de NGF (fig.2,A). Estos datos se confirmaron utilizando la técnica de RT-PCR semicuantitativo (que se describe en el apartado de materiales y métodos) utilizando β -Actina como control de carga de RNA en las muestras iniciales. Las reacciones de amplificación antes de alcanzar la saturación. Los fragmentos amplificados de NMDAR1 y 2C una vez resueltos en un gel de agarosa mostraban bandas cuantitativamente equivalentes entre las muestras control y tratadas, para una misma cantidad de RNA inicial como indicaban los niveles de β -Actina de ambos. (fig.3)

La presencia de transcritos específicos para el gen de la subunidad 2D, en células control o tratadas no pudo ser detectada por RT-PCR con primers específicos en un análisis posterior (datos no mostrados).

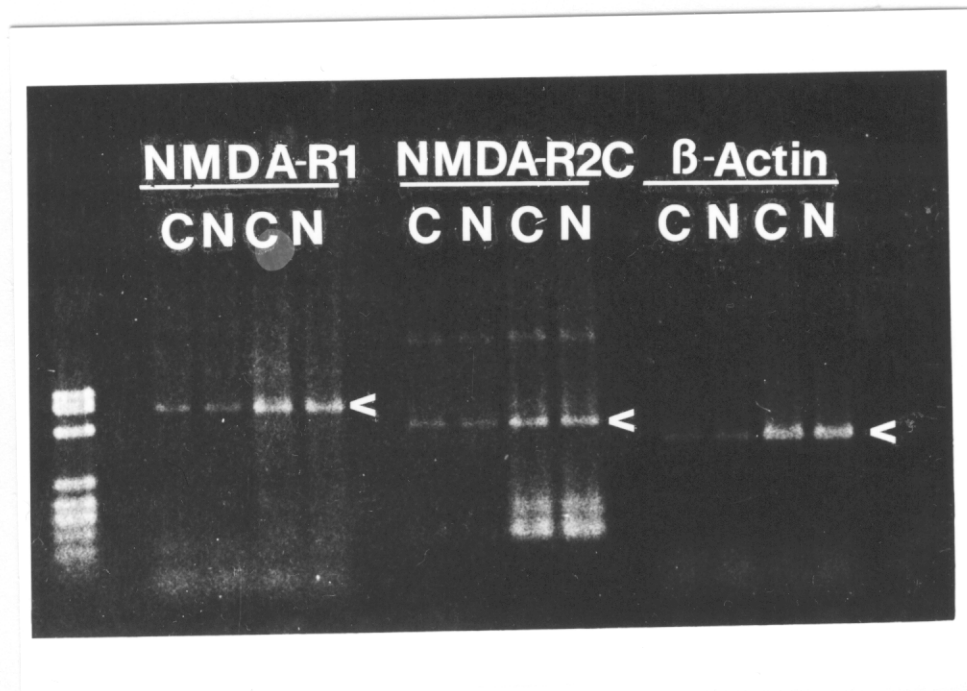


Figura 3. PCR semicuantitativo de las subunidades NMDA-R1 y 2C en células PC12
 Resolución en gel de agarosa de 10 μ l de muestra extraídas de las reacciones de PCR para NMDA-R1 y 2C, a los 20 y 25 ciclos de amplificación a partir de las muestras de células PC12 control (C) y tratadas con NGF (N). La reacción de amplificación para β -Actina (β -Actin) a partir de las mismas muestras fue analizada a los 15 y 20 ciclos de amplificación en el mismo gel.

Las ocho variantes de NMDAR1 que pueden generarse por procesamiento alternativo de tres exones, pueden conferir diferencias electrofisiológicas en receptores funcionales de NMDA, según la isoforma de NMDAR1 que participe en el complejo del receptor. Por ello se intentó caracterizar las isoformas expresadas por las células PC12 con objeto de validar, en receptores nativos, la correlación entre la identidad molecular y función que se había establecido anteriormente en sistemas de transfección celular. Para la identificación de las isoformas de NMDAR1 presentes en las células PC12 se utilizó la técnica de RT-PCR, a partir de ARN total, extraído de células tratadas y control, con diversas parejas de amplímeros, que flanqueaban las zonas de procesamiento alternativo dando como resultado productos de amplificación de distinto tamaño dependiendo de la presencia o ausencia de los exones, como verificaba las muestras de ARNm de cerebro. Mediante la utilización de los amplímeros a ambos lados del exón alfa (primers 1 y 2) se reveló la ausencia de isoformas que contuvieran el exón alfa tanto en células PC12 control como después de la diferenciación neuronal. La banda amplificada correspondía a la de menor tamaño obtenida en el cerebro y excluía un lugar de restricción único para la enzima Taq, presente en el exón α (fig.4). El análisis de los exones beta y gamma con los primers 3 y 4 dio como resultado la amplificación de tres fragmentos que correspondían a las isoformas $-\beta$ $-\gamma$, $+\beta-\gamma$, $-\beta+\gamma$ (fig.2,B). No pudo detectarse la isoforma $+\beta+\gamma$ con este par de amplímeros, ni siquiera en un control positivo con ARN total de cerebro de rata. Esto podía ser debido a la presencia de una región rica

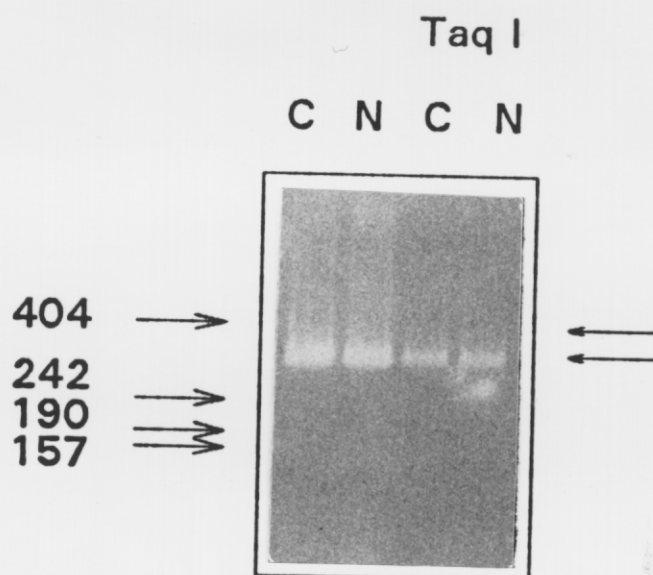
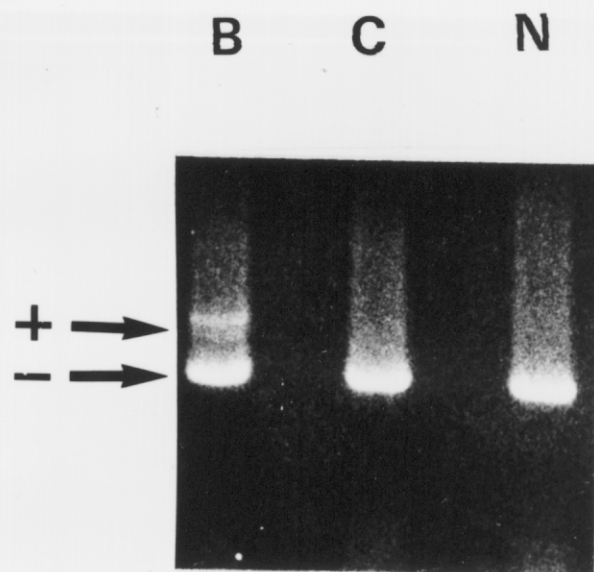


Figura 4. Análisis por PCR del exón α de NMDA-R1 en células PC12

A, La amplificación de la región del exón α con primers flanqueantes resultaba en dos fragmentos de distinto tamaño según su presencia (+) a ausencia (-) como se observaba en la muestra de cerebro (B), las muestras de células PC12 control (C) y diferenciadas con NGF presentaban únicamente el fragmento de menor tamaño que excluye el exón α . B, La exclusión de la diana de restricción para la enzima TaqI que se encuentra en el interior del exón α , demostraba la identidad de la banda amplificada tanto para la muestra control (C) como para la perteneciente a las células PC12 tratadas, tras una reacción de digestión.

en guaninas y citosinas dentro del exon beta (Moriyoshi et al., 1991). Este tipo de secuencias pueden conferir restricciones conformacionales a las moléculas de ácidos nucleicos que podría dificultar la polimerización por la enzima Taq en esa región. Para intentar sobrepasar este problema se diseñó una pareja adicional de primers (5 y 6) situados dentro de los exones beta y gamma (fig.2,C). Con estas condiciones se obtuvo un fragmento amplificado de 144 pares de bases que correspondía a la presencia de la isoforma que contenía tanto el exon beta como el exon alfa (fig.2,C).

Análisis por Western Blot de la proteína NMDAR1 presente en las células PC12

Utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína NMDAR1, se identificó una banda inmunoreactiva de 116 kDa en extractos proteicos de cerebro de rata y de células PC12. La diferenciación neuronal por NGF, en este caso llevaba a un aumento sustancial (8 veces) en la cantidad de proteína NMDAR1 (fig.5). El aumento en proteína NMDAR1 era máximo después de cinco días de tratamiento con NGF.

Registros electrofisiológicos llevados a cabo en paralelo con estos experimentos demostraron la activación de corrientes entrantes cuando se perfundió glutamato o NMDA en presencia de glicina en células PC12 a un potencial de membrana de -70 mV con fijación de voltaje en modalidad de célula entera. En contraste no se activaron corrientes con la aplicación de

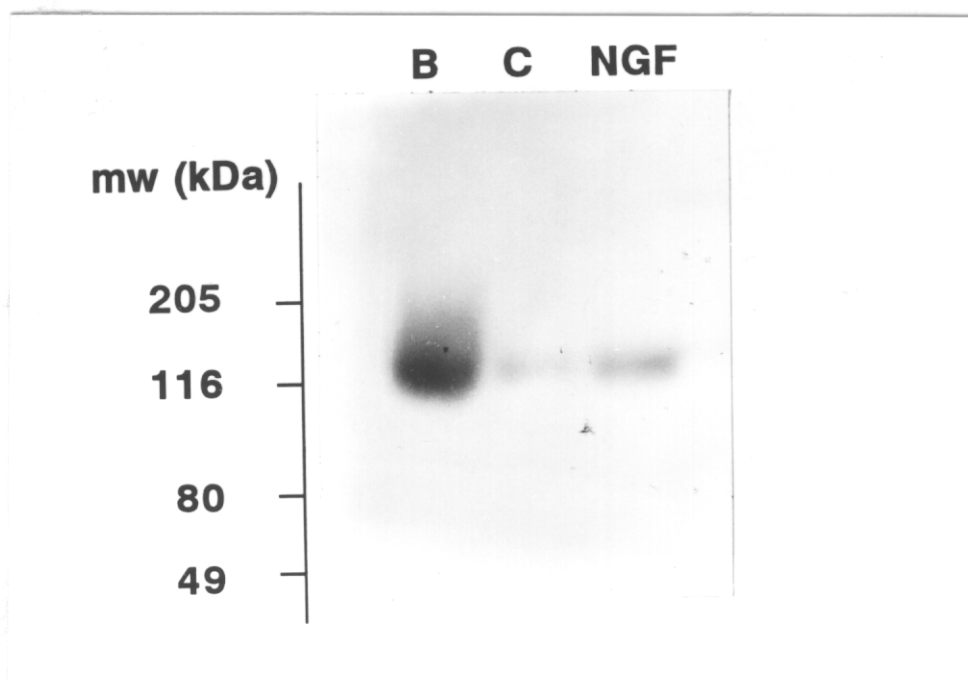


Figura5. Análisis de Western Blot de la proteína NMDAR1 en células PC12 control (C) y diferenciadas con NGF

Extracto de proteína preparado a partir de cerebro de rata adulta (B) fue procesado en paralelo como control positivo. Se indica la migración de los marcadores (kDa)

kainato (300 μ M). Las corrientes de NMDA o glutamato mostraban las características típicas de las corrientes mediadas por receptores de NMDA, y el tratamiento con NGF resultaba en un aumento de la amplitud de estas respuestas. Las respuestas se bloqueaban completamente por el antagonista competitivo ácido D(-)-2 amino -5-fosfopentanoico (APV), y por el antagonista del sitio de glicina ácido 7-clorokinurenico (7-Cl-Kyn), y eran potenciadas por glicina y presentaban un bloqueo por magnesio dependiente de voltaje. Mostraban además características especiales relacionadas con heterómeros recombinantes NMDAR1-2C (Monyer et al. 1992), como la no desensibilización en presencia de glicina saturante y el bloqueo de Mg^{2+} incompleto incluso a altos potenciales de hiperpolarización. El análisis de canal-único de los receptores NMDA de PC12 mostro una fuerte similitud con los propiedades reportadas para la combinación de NMDAR1A-NMDAR2C expresada en oocitos (Stern et al., 1992). A altas concentraciones de calcio extracelular se producía una reducción en la conductancia unitaria de canal que resultaba en una disminución de la respuesta en modalidad de célula entera. Este efecto es indicativo de que los canales de NMDA son bloqueados por el calcio al permear por el canal. Estos datos funcionales estaban en concordancia con los resultados moleculares.

La toxicidad de glutamato en células PC12 no es mediada por receptores de NMDA

Se comprobó que la presencia de estos receptores funcionales en la membrana de las células PC12 diferenciadas no era suficiente para desencadenar la muerte celular tras la exposición durante cinco minutos en medio libre de magnesio a NMDA (500 μ M) que en otros sistemas se había descrito como tóxicas.

El aumento en las respuestas electrofisiológicas determinado por la diferenciación neuronal inducida en las células PC12 por administración del factor de crecimiento nervioso NGF, no es suficiente para determinar muerte de la célula probablemente por una entrada limitada de calcio.

Shubert y colaboradores (1992) habían descrito un efecto tóxico de glutamato en las células PC12. En estos experimentos el glutamato (1-10 mM) aplicado al medio de cultivo de forma crónica inducía lisis celular como se determinaba por la medida de LDH liberado al medio, al cabo de las 24 horas. Se demostraba que la exposición de estas células a NGF producía un aumento progresivo en su sensibilidad a glutamato. El efecto de glutamato no parecía estar mediado por los receptores de NMDA ni ningún otro receptor de glutamato como demostraban los estudios con agonistas y antagonistas (solo pudo reproducirse con la administración de quisquállico) y era parcialmente revertido por vitamina E a 10 μ g/ μ l. La cinética y la farmacología de la acción citotóxica del glutamato sobre las PC12 no correspondían al efecto excitotóxico mediado por receptores ionotrópicos, pero la necesidad de presencia

continuada de la droga al menos durante 6 horas y el retraso en la aparición de citotoxicidad indicaban que se trata de un efecto del glutamato de baja afinidad metabólico y no un mecanismo necrótico inespecífico. El efecto protector de la vitamina E frente a la muerte celular inducida por el glutamato sugiere que las células mueren por generación de radicales libres y estrés oxidativo.

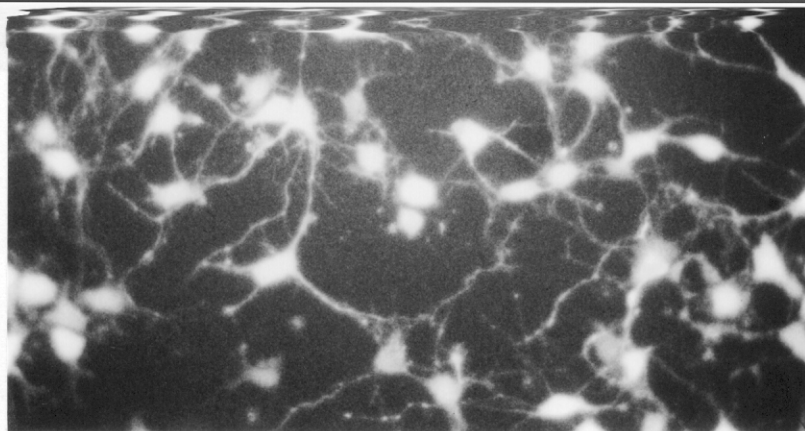
En cultivos inmaduros de neuronas de corteza el glutamato ejerce un efecto neurotóxico que conduce a un estrés oxidativo por bloqueo del transportador de cistina que podría estar relacionado con la lisis inducida por glutamato en las células PC12. Se pasó, en este punto a estudiar en detalle este sistema, en el que la muerte neuronal parecía estar desencadenada por un mecanismo de estrés oxidativo puro sin interacción de otras vías.

CULTIVOS INMADUROS

Con el fin de identificar los posibles genes o cascada de genes, cuya expresión temporal resulta en la muerte neuronal al margen de el mecanismo desencadenante; se pensó que el empleo de neuronas inmaduras en cultivo podría ser un sistema adecuado. En dicho sistema el glutamato no parece ejerce sus efectos tóxicos a través de activación mediada por receptores de flujos iónicos transmembrana o fosfatidilinositoles (Murphy y Baraban, 1990) sino que más bien parece ser resultado de la habilidad del glutamato para inhibir competitivamente la entrada del aminoácido cistina en su transportador de membrana (Murphy et al., 1989, 1990). Esta inhibición conduciría a la deplección del antioxidante intracelular glutatión y a la muerte por estrés oxidativo.

En este trabajo utilizamos células de corteza e hipocampo a partir de fetos de rata en edad embrionaria 17 días. En estos cultivos se añadía al medio glutamato en el día uno *in vitro* y a las 24 horas de aplicación se determinaba su efecto sobre la viabilidad celular mediante una tinción vital (fig.6). El porcentaje de supervivencia celular se determinó entre los núcleos celulares positivos para la tinción con yoduro de propidio, lo cual es indicativo de un cierto grado de disrupción en la membrana, y las células que permanecían vivas y eran capaces de metabolizar el acetato de

A



B

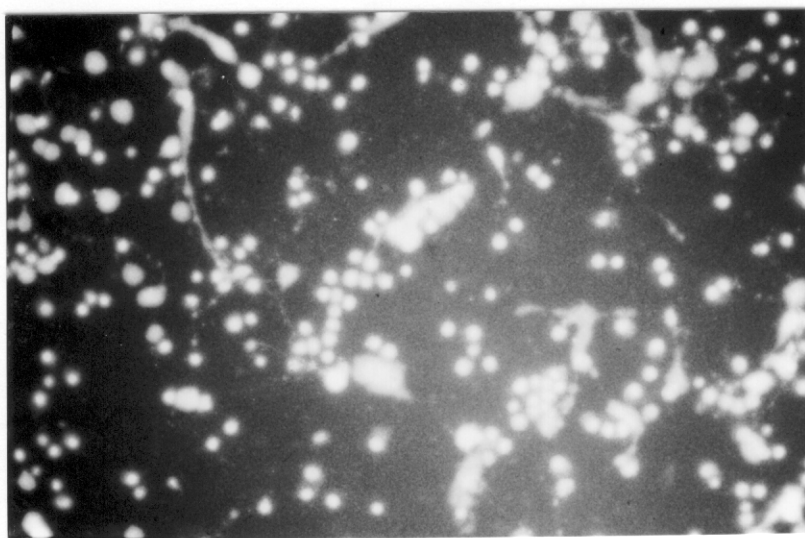
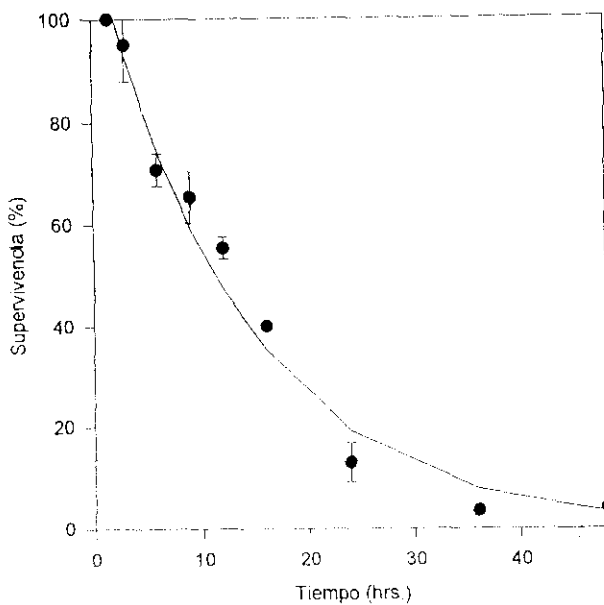
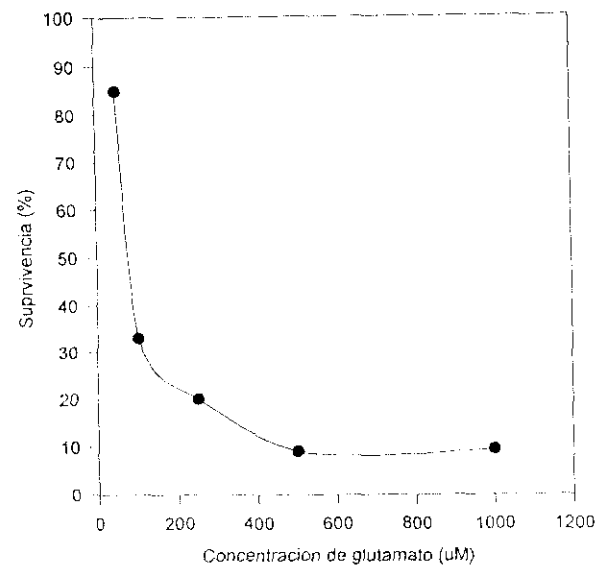


Figura 6. Tinción Vital encultivos inmaduros

La tinción se realizó en cultivos control (C) de 1DIV y cultivos tratados con glutamato durante 24 horas (B) donde se aprecia la tinción de ioduro de propidio en los núcleos.

fluoresceína. Tras un estudio de dosis respuesta se determinó que el efecto neurotóxico del glutamato era saturable a partir de una concentración de 500 μ M en el medio exterior. La exposición a esta concentración de neurotransmisor durante 24 permitía observar una degeneración progresiva que afectaba a 80% de las células en cultivo (fig.7).

Tratamientos paralelos con distintos agonistas y antagonistas de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos demostraron que estos receptores no eran mediadores del componente mayoritario del efecto tóxico ejercido por el glutamato. La activación de receptores de NMDA en este sistema se descartó observando que el tratamiento con el antagonista competitivo de estos receptores, D-Aminofosfonovalerato (APV, 500 μ M) no ejercía un efecto significativo sobre la supervivencia de los cultivos expuestos a glutamato. El KA ejercía una cierta toxicidad a 300 μ M que era bloqueada por CNQX (100 μ M), el antagonista de los receptores no-NMDA de glutamato (fig.8). Actualmente ha sido demostrada en diversos tipos neuronales una cierta permeabilidad a Ca^{2+} de los receptores de AMPA/KA que podría desencadenar el proceso de muerte. Coadministrando AMPA y Kainato en los cultivos inmaduros se producía un aumento en el porcentaje de supervivencia obtenido con el tratamiento de Kainato aislado; este hecho podría estar indicando una contribución de los receptores de AMPA en la toxicidad atribuida a kainato ya que estos receptores son capaces de activarse por kainato de forma no desensibilizante mientras que en presencia de su agonista específico se desensibilizan rápidamente. En un análisis farmacológico más

A**Secuencia temporal de la muerte neuronal tras aplicación de glutamato (500 μ M)****B****Curva de dosis respuesta de la supervivencia neuronal tras glutamato****Figura 7.Efecto del glutamato extracelular sobre los cultivos inmaduros**

A, Se aplicaron distintas concentraciones de glutamato al medio de cultivo de células en el día 1 *in vitro* y se midió la supervivencia en las placas de cultivo al cabo de las 24 horas en presencia cónica del neurotransmisor. B, La supervivencia de los cultivos se determinó a distintos tiempos tras la aplicación de glutamato (500 μ M) al medio extrcelular. El porcentaje de supervivencia celular se determino mediante tinción vital, entre las células que permanecían vivas y las que presentaban signos de degeneración o muerte.

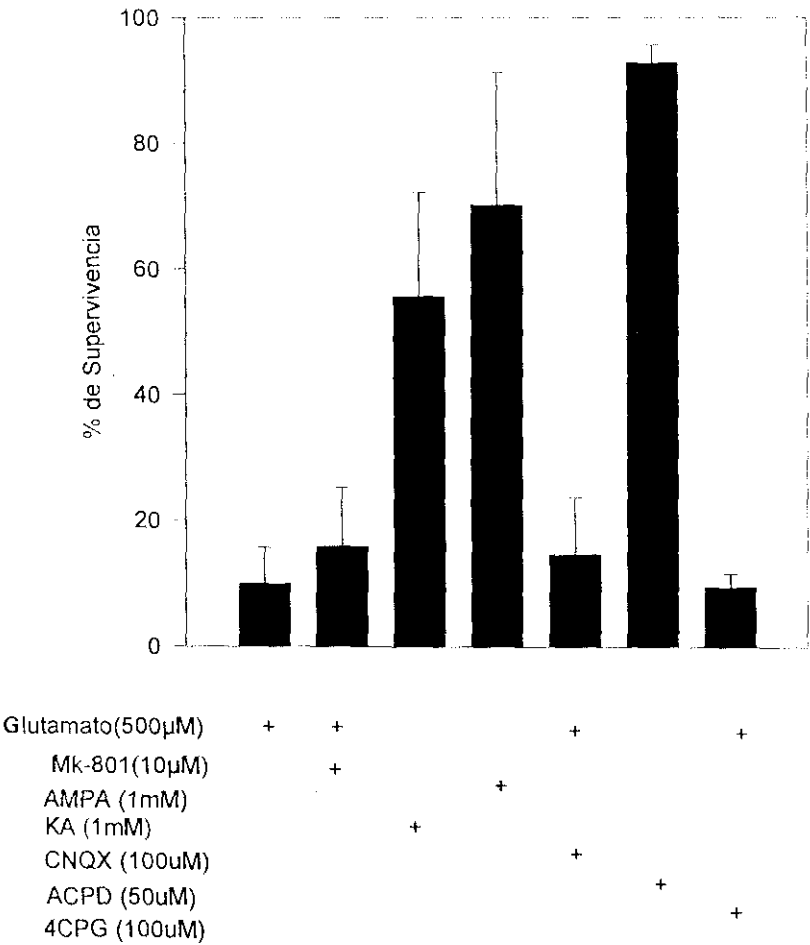
detallado posterior se evaluó la toxicidad de AMPA, que aplicado de forma aislada resultaba inefectivo; en presencia de ciclotiazida que inhibe la desensibilización de estos receptores, se comprobó que este tratamiento disminuía el porcentaje de supervivencia celular hasta un nivel equiparable al obtenido con el tratamiento con kainato anterior y este efecto era inhibido con el antagonista de los receptores de AMPA, NS394 (10 μ M). Se desenmascaraba de esta manera un pequeño efecto neurotóxico mediado por AMPA en los cultivos (fig.8).

En estudios electrofisiológicos con la técnica de clampeo de voltage en configuración de célula entera, el desarrollo de respuestas depolarizantes a glutamato o sus agonistas aplicados exogenamente muestra un patron temporal respecto a la maduración neuronal con el tiempo en cultivo concordante con estos resultados. Así, los receptores para NMDA parecen estar ausentes o a muy baja concentración en los primeros días en cultivo hasta aproximadamente el día 3 *in vitro* y por el contrario pueden identificarse receptores funcionales de Kainato y de AMPA en la membrana de las neuronas desde el primer día de cultivo, que iban aumentando su respuesta en sucesivos días.

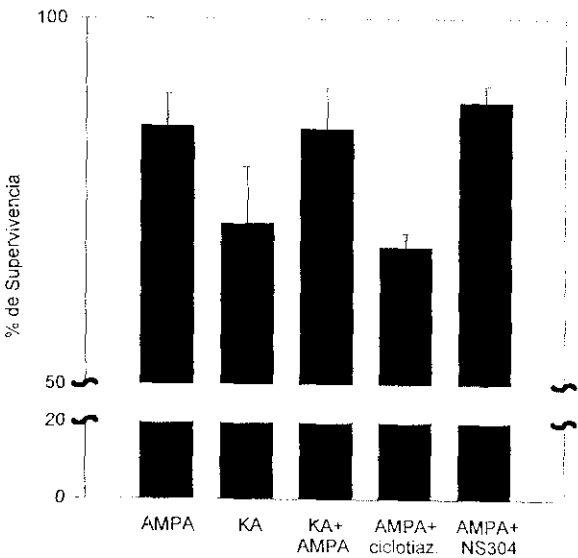
La participación de los receptores de glutamato en cualquier caso resultaba una parte minoritaria en la mediación del efecto tóxico global la aplicación de glutamato en el medio de cultivo, que no era reproducido tampoco por el agonista de los receptores metabótrópicos ACPD(50 μ M) ni bloqueado por su antagonista 4CPG (100 μ M) (fig.8.)

Los receptores ionotrópicos y/o metabotrópicos de glutamato no median el estrés oxidativo en cultivos inmaduros

Figura 8.



Estudio farmacológico de los receptores de AMPA en cultivos inmaduros



Otros agentes que se conocen como citotóxicos como la estaurosporina ; inhibidor de la Pkc no parecieron ejercer un efecto significativo sobre la supervivencia de las células en cultivo incluso a altas concentraciones.

Por el contrario el efecto neurotóxico del glutamato era totalmente revertido si se coadministraba con vitamina E. Este conocido antioxidante era capaz de bloquear completamente la extensión de la muerte celular inducida por glutamato en el cultivo 10 horas después de su aplicación.(fig.9). La supervivencia de los cultivos tratados con vitamina E era incluso superior a la que se observaba en los controles probablemente debido a la protección frente a especies oxidantes presentes en el medio de cultivo ocurrentes de forma constitutiva en el cultivo. Un efecto similar de protección se observó aplicando un inhibidor de la síntesis macromolecular como la cicloheximida ($5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), que era capaz de "rescatar" a las células supervivientes en el cultivo hasta 6 horas después de la exposición a glutamato (fig.9). La morfología de las células en las placas tratadas con cicloheximida ofrecía un aspecto poco diferenciado, consecuencia de la inhibición temprana de la síntesis proteica.

Estos datos sugerían la activación de un proceso activo que requería la síntesis de posibles proteínas efectoras de un mecanismo que conducía a la muerte en las células expuestas a glutamato. Se procedió entonces a la determinación del lapso temporal que transcurría hasta que el proceso resultaba irreversible desde la aplicación del neurotransmisor. En estos experimentos el medio de las placas de cultivo expuestas a glutamato se reemplazaba a distintos tiempos de incubación por

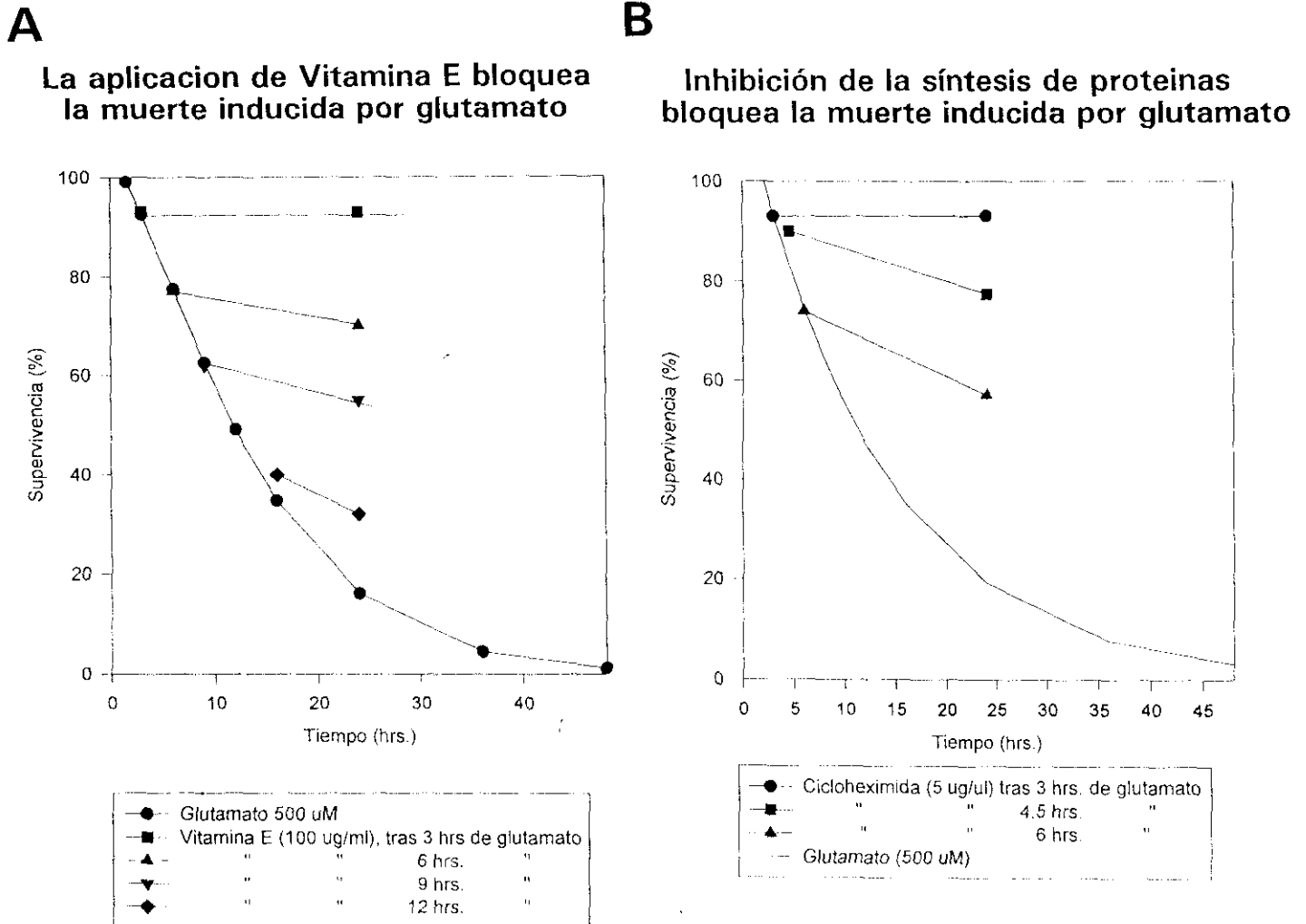


Figura 9. Efecto protector de vitamina E y cicloheximida sobre la toxicidad del glutamato en cultivos inmaduros

Añadiendo vitamina E (A) o cicloheximida a distintos tiempos en cultivos inmaduros en presencia crónica de glutamato se determinó el porcentaje de supervivencia transcurridas 24 horas de tratamiento con glutamato. Sobreimpuesto al efecto de los tratamientos con vitamina E y cicloheximida aparece en las gráficas la secuencia temporal de la muerte celular en cultivos tratados crónicamente con glutamato.

medio de cultivo fresco. En estos cultivos, las células que continuaban vivas eran capaces de sobrevivir si se retiraba el glutamato del medio hasta las 16 horas de exposición, momento a partir del cual solo se alcanzaba un 20% de supervivencia a las 24 de la aplicación de glutamato.

Este punto temporal en el que parecía haberse desencadenado un proceso de muerte irreversible fue el elegido para la determinación de una posible inducción génica. El posible efecto sobre la expresión génica podría ser analizado en distintas placas de un mismo cultivo, después de ser tratadas o no con el neurotransmisor, por técnicas de análisis de ARN.

Inducción de genes tempranos por glutamato extracelular en cultivos inmaduros

A partir de este momento el trabajo se centró por un lado en el estudio de la expresión en nuestro sistema de los llamados genes tempranos descritos previamente en otros modelos, p.e. *c-fos*, *c-jun*, que actúan como factores de transcripción y por otro lado en línea con la dependencia del fenómeno neurotóxico de un proceso activo de síntesis de nuevas proteínas, en la caracterización de genes de inducción secundaria posibles dianas de transactivación de los anteriores y directamente involucrados en el desenlace del proceso citotóxico.

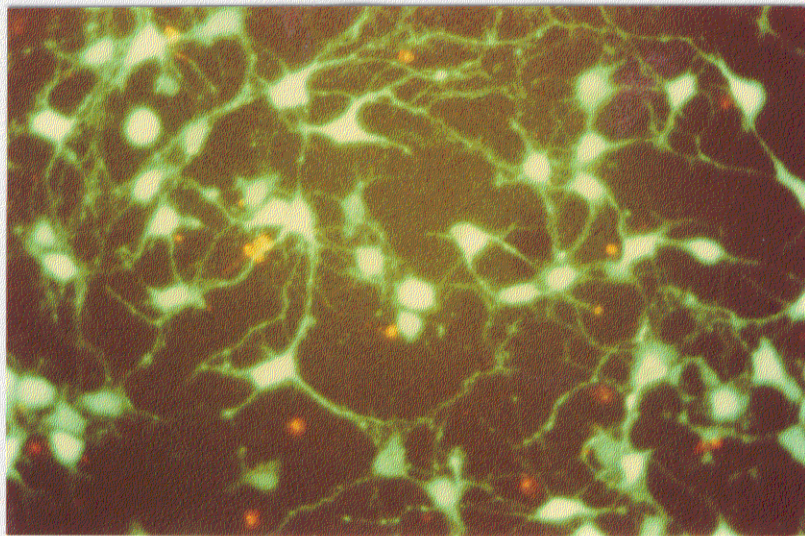
Para el estudio de la inducción de genes tempranos se recurrió a la técnica de Northern Blot. Se extrajo el ARN celular a distintos intervalos de exposición al neurotransmisor de 30 minutos, 1, 3 y 16 horas. A estos distintos tiempos se

determinaron mediante hibridación con sondas radioactivas para *c-fos* y *c-jun* los niveles de expresión de ARNm de estos genes. Estos experimentos permitieron cuantificar los cambios en los niveles de expresión tras el tratamiento con glutamato que alcanzaban un nivel máximo entre 30 minutos y una hora (fig.10). Los niveles basales de expresión exhibidos en los cultivos control (que no habían sido expuestos a glutamato), se recuperaba a las 16 horas de la aplicación del estímulo. La inducción de este tipo de genes en células postmitóticas neuronales esta asociada con una via de acoplamiento estímulo-transcripción. Los productos de *c-foc* y *c-jun* forman parte de una superfamilia de factores de transcripción que pueden formar complejos protéicos heterodiméricos en interacción con el ADN. El complejo Fos-Jun se une a reconoce la secuencia consenso AP-1 en el ADN que corresponde a la proteína 1 activador de factores de transcripción.

Bloqueo de la expresion de *c-fos* por oligonucleotidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido constituyen una herramienta que fue empleada por primera vez para bloquear de forma específica la expresión de protooncogenes nucleares en células en cultivo (Heikkila et al.,1987). Dependiendo del tipo celular y del gen diana, puede variar la concentración de oligonucleótido y el tiempo de incubación necesarios para producir el efecto. Por este motivo en nuestro laboratorio se habia analizado el efecto, en un modelo similar *in vitro*, de

A



B

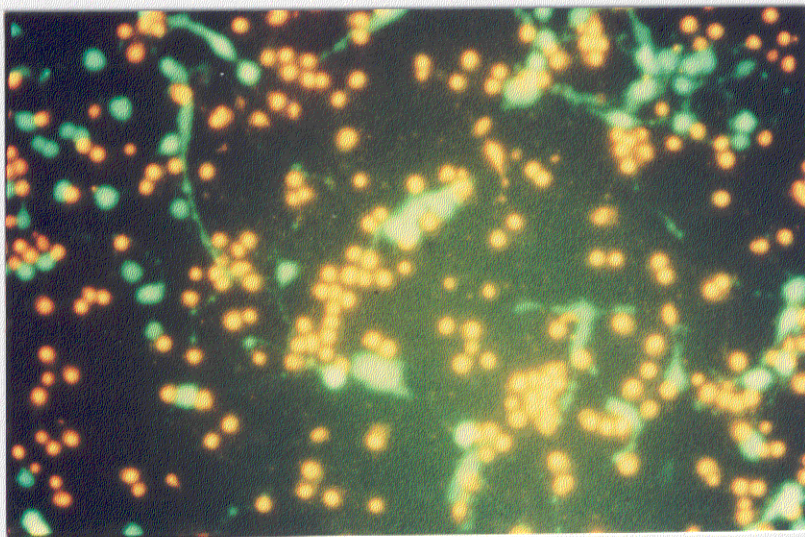


Figura 6. Tinción Vital en cultivos inmaduros

La tinción se realizó en cultivos control (C) de 1DIV y cultivos tratados con glutamato durante 24 horas (B) donde se aprecia la tinción de yoduro de propidio en los núcleos.

un oligonucleótido complementario a los primeros cinco codones codificantes de *c-fos* a distintas concentraciones y distintos tiempos de incubación. El estudio fue llevado a cabo mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo contra la proteína c-Fos y con diversos estímulos. La incubación a una concentración de 40 μ M, suprimió por completo la aparición de núcleos inmunoreactivos para c-Fos tras el estímulo (datos no mostrados).

Utilizando estas mismas condiciones para el tratamiento de los cultivos inmaduros con el oligonucleótido antisentido de *c-f6s* no se observó ninguna variación sobre la neurotoxicidad observada anteriormente tras la estimulación con glutamato como consecuencia de la supresión de la expresión del gen (fig.11).

Tratamiento de cultivos inmaduros con el oligonucleótido antisentido c-fos

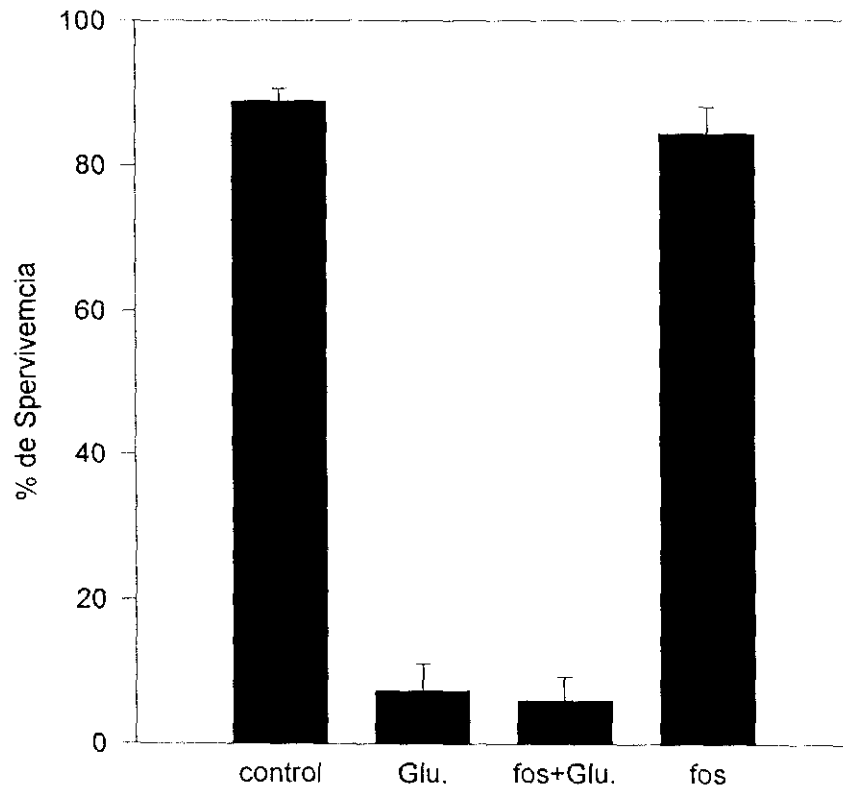


Figura 11. Supresión de c-Fos en cultivos inmaduros

El oligonucleótido antisentido par c-fos se incubo en el medio de los células encultivo a una concentración de final de 40 μ M. La viabilidad celular se evaluó transcurridas 24 horas tras la aplicación de glutamato por el método de la tinción vital en cultivos tratados (fos+Glu.) y no tratados (Glu.) con el oligonucleótido antisentido . En paralelo se tiñeron placas de cultivo control y tratadas únicamente con el oligonucleótido antisentido (fos).

Inducción de cox-2 por glutamato

El gen *cox-2* es un gen temprano que codifica para una cicloxigenasa inducible, que se expresa en poblaciones discretas neuronales relacionado con actividad sináptica y situaciones patológicas (Yamagata et al., 1993). Para el estudio de la expresión del gen *cox-2* se recurrió a la técnica de RT-PCR semicuantitativo anteriormente descrita, debido a su baja abundancia relativa en los cultivos inmaduros. Mediante esta técnica se detectó un aumento en los niveles de ARNm de *cox-2* al cabo de 30 minutos tras la aplicación de glutamato y esta inducción se mantenía durante las 3 horas posteriores (fig.12).

El fragmento amplificado por PCR de 964 pares de bases fue purificado de posibles contaminantes a partir de la banda discreta que se obtenía en un gel preparativo de agarosa al 1%, utilizando la matriz (resina) GLASSMILK que proporciona el kit GENE CLEAN (Bio 101) e insertado en el vector pGEM-T diseñado para el clonaje de productos de PCR siguiendo el protocolo del comerciante (pGEM-T Vector systems, Promega). La región de *cox-2* amplificada inicialmente, presentaba baja homología con otros genes pertenecientes a la misma familia y la expresión del inserto en esta construcción permitía disponer de material para generar una sonda radioactiva marcada con d-CTP³² que se utilizó para el análisis por Northern Blot. La hibridación de lo Northern Blot con esta sonda daba una señal de baja intensidad a la altura del tamaño esperado para el ARNm de

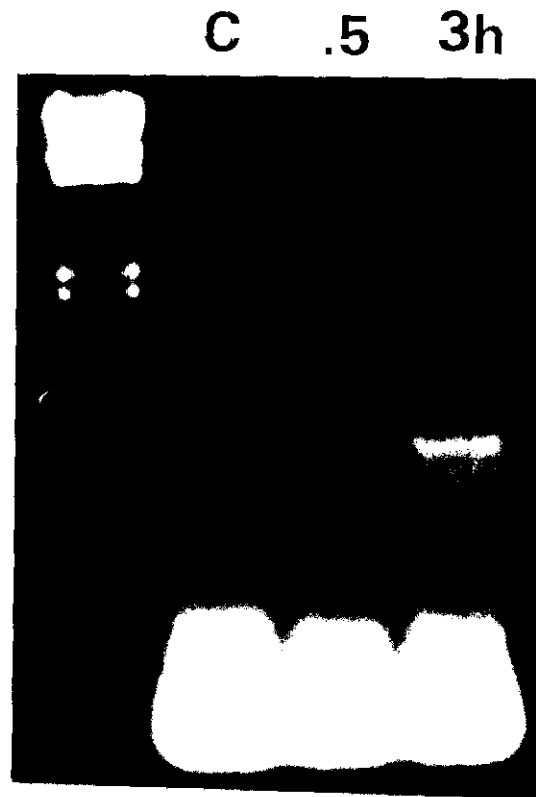


Figura 12. Análisis por PCR semicuantitativo de la inducción de cox-2 en cultivos inmaduros. Se resolvió una banda de 964 pbs. de cox-2, a partir de las reacciones de amplificación a un número de ciclos de infraturación (20) las muestras control y expuestas a glutamato 30 minutos y 3 horas, en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

cox-2 (~4 kb) y confirmaba la inducción del gen tras el tratamiento con glutamato (fig.13)

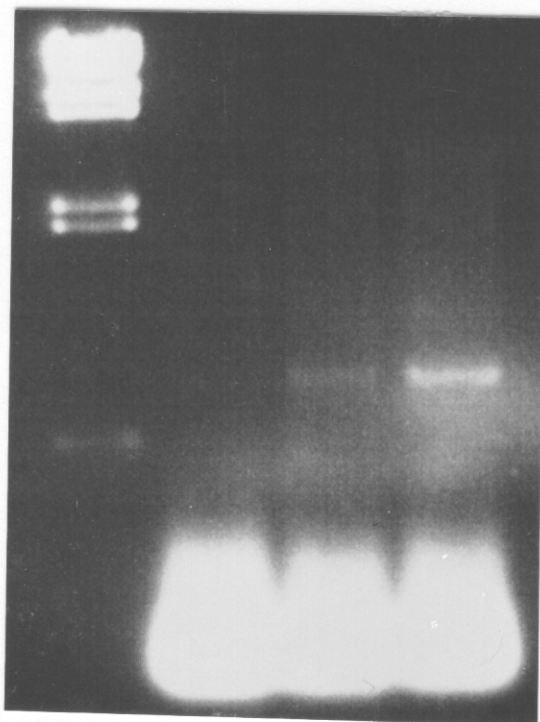
Supresión de Cox-2 con oligonucleótidos antisentido

Se llevaron a cabo estudios sobre la supresión de la traducción del ARNm de COX-2, mediante un oligonucleótido antisentido en experimentos equivalentes a los llevados a cabo con el factor de transcripción *c-fos*. La incubación de los cultivos con el oligonucleótido antisentido (40 μ M) previa a la exposición al neurotransmisor, reducía la mortalidad celular determinada a las 24 horas de aplicación de glutamato de forma significativa (40%). Para comprobar la especificidad del efecto que el oligonucleótido ejercía sobre el transcrito de *cox-2*, se llevaron a cabo incubaciones con oligonucleótidos sentido y antisentido mutados (random) que presentan secuencias equivalentes al antisentido pero no complementarias con el ARNm. La presencia de estos oligonucleótidos sentido y antisentido mutado no produjo ningún efecto sobre la viabilidad celular tras el tratamiento con glutamato. Así mismo se determinó el efecto de la incubación aislada del antisentido sin posterior administración de glutamato y se observó un porcentaje de supervivencia equiparable a el obtenido en las placas control, descartando un posible efecto tóxico inespecífico por la presencia del nucleótido en el medio de cultivo (fig.14).

La ciclooxigenasa cataliza la síntesis de prostaglaninas y tromboxanos a partir de ácido araquidónico en una reacción

C .5 3h

Figura 12. Análisis por PCR semicuantitativo de la inducción de cox-2 en cultivos inmaduros. Se resolvió una banda de 964 pbs. de cox-2, a partir de las reacciones de amplificación a un número de ciclos de infrasaturación (20) las muestras control y expuestas a glutamato 30 minutos y 3 horas, en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.



Tratamiento de cultivos neuronales inmaduros con el oligonucleótido antisentido cox-2

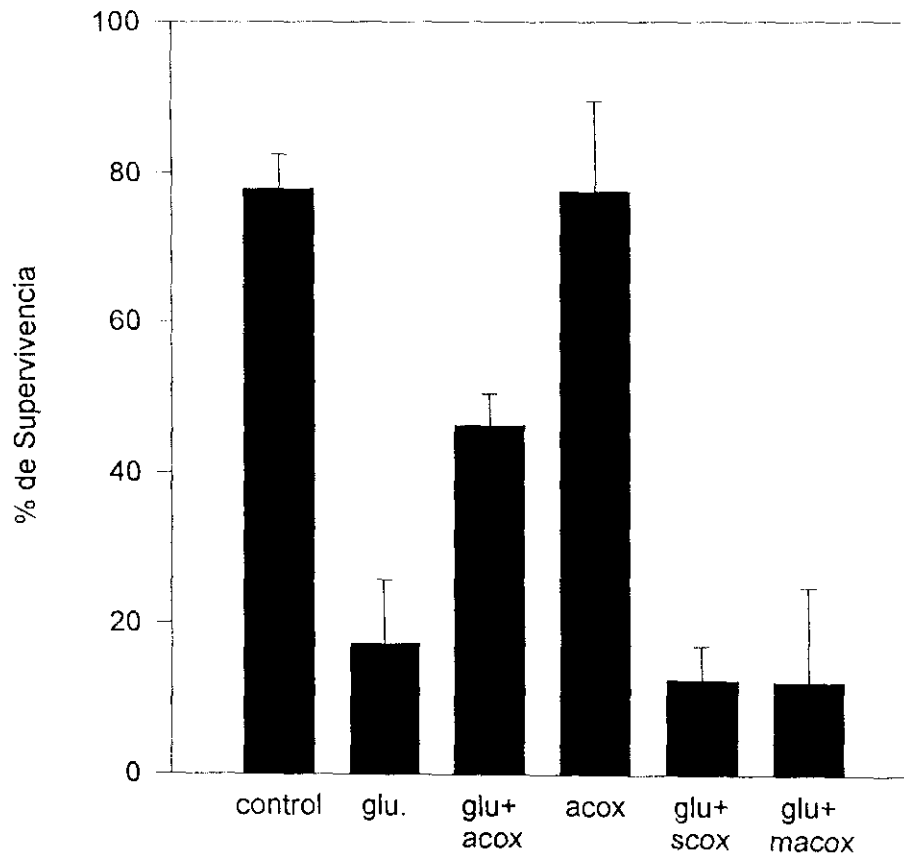


Figura 14. Supresión de la traducción de Cox-2 en cultivos inmaduros expuestos a glutamato
Los cultivos fueron incubados con oligonucleótidos antisentido, sentido y antisentido mutado (ver texto) y su viabilidad evaluada a las 24 horas tras la aplicación de glutamato en el medio de cultivo. Los cultivos control y expuestos únicamente a glutamato se procesaron paralelamente. La viabilidad celular se estimó mediante el método de la tinción vital.

que implica la generación de radicales de oxígeno. La inducción específica de este gen en los cultivos inmaduros tratados con glutamato podría indicar un papel en el proceso de muerte por estrés oxidativo como gen efector. Se construyeron sendas genotecas de cADNa partir de ARN polyA⁺ extraído de cultivos control y tratados con glutamato durante 16 horas en vectores de expresión utilizando el kit comercial TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia). Se generó una sonda radioactiva a partir del producto de PCR de la genoteca tratada, marcada con P³² por el método de "random primer" (oligolabelling kit , Pharmacia) en la que estaban representados de forma proporcional los distintos genes expresados por las células en el momento de la extracción del ARN. Con esta sonda se hibridó un dot blot con cADNs de distintos genes conocidos de expresión constitutiva y otros cuya expresión esta relacionada con procesos de muerte, apoptosis o ciclo celular, entre los que se incluía cox-2. El filtro se lavó tras la hibridación en condiciones de alta estringencia y después de su exposición y revelado autorradiográfico se podía observar el marcaje de cADN de cox-2c como una demostración de que su expresión se mantenía inducida después de 16 horas de exposición de las células a glutamato y podría tener una funcionalidad relacionada con la muerte célula.

Las genotecas de cADN fueron sometidas a la técnica de hibridación substractiva que se detalla en el apartado de materiales y métodos y que permite identificar genes expresados diferencialmente entre dos poblaciones de cDNAs . La hibridación se realizó utilizando la genoteca perteneciente

a las células tratadas con glutamato como "target" y la genoteca control como "driver" y las moléculas monocatenarias no hibridadas obtenidas se utilizaron como molde para la generación una nueva colección de cADNs según se indica en el protocolo. La transformación competentes con esta genoteca sustraída ha dado lugar a la identificación de clones positivos en la hibridación con la sonda sustraída en un primer "screening". La confirmación de estos positivos y su posterior caracterización deberá realizarse mediante un segundo screening. Estos clones representan especies génicas que aparecerían diferencialmente o de forma enriquecida en los cultivos inmaduros sometidos a tratamiento crónico con glutamato durante 16 horas y que podrían jugar un papel funcional en el proceso de muerte por estrés oxidativo al que parece conducir este tratamiento.

DISCUSION

En mamíferos muchos de los procesos de muerte neuronal producidos por traumatismos o situaciones patológicas implican la generación de radicales libres y aumentos de la concentración extracelular aminoácidos excitatorios. Para establecer el proceso común que conduce a la muerte de las neuronas y la implicación de estos mecanismos, es importante buscar sistemas celulares definidos en los que se pueda aislar la evolución de las distintas vías.

El glutamato puede acumularse en el espacio extracelular en distintas situaciones patofisiológicas. Las neuronas difieren individualmente en su vulnerabilidad a glutamato según el repertorio de receptores y canales iónicos que presenten. La predominancia de receptores de NMDA parece conferir especial susceptibilidad a las neuronas al dno excitotóxico, que parece mediado por la entrada de Ca^{2+} a través del canal iónico asociado al receptor de NMDA. Para intentar estudiar el proceso excitotóxico de forma aislada en una población homogénea se sondearon líneas celulares para la expresión de receptores de NMDA.

Se comprobó la expresión de receptores funcionales de glutamato tipo NMDA en la línea celular PC12. La diferenciación de estas células a fenotipo neuronal con NGF no produjo cambios cuntitativos ni culitativos en la expresión de las subunidades del receptor de NMDA presentes, NMDAR1 y

NMDA2C, aunque se observa un aumento de la proteína NMDAR1 de 8 veces tras el tratamiento. Esta discordancia entre los niveles de mensajero y traducción de proteína para la subunidad NMDAR1 podría sugerir una regulación post-transcripcional cuyo estudio quedaba fuera de la línea del trabajo, aunque podría guardar relación con los mecanismos de diferenciación del NGF. Por otro lado la existencia de mayores niveles de proteína de la subunidad NMDAR1 en la membrana de las células PC12 diferenciadas no parecía determinar un aumento de la densidad de canales funcionales como se extrapolaba a partir de la correlación entre el aumento de corriente y el aumento paralelo de superficie de membrana (tamaño celular) que se estimaba a partir de la capacitancia (Casado et al., 1995). Los niveles de proteína de la subunidad tipo 2C presentes en estas células podrían ser el factor limitante en la formación de heterómeros funcionales. Las células PC12 diferenciadas con NGF exhibían una mayor amplitud de corriente al activar los receptores de NMDA que la registrada para las células indiferenciadas, a pesar de lo cual la exposición a concentraciones tóxicas del fármaco era inefectiva para producir lisis celular. La caracterización molecular de los receptores de NMDA presentes en las células PC12 demostró que se trataba de heterómeros compuestos por las subunidades NMDAR1A y NMDAR2C, que presentan un bloqueo característico de los iones de Ca^{2+} al permear por el canal. La baja densidad de receptores funcionales de NMDA y sus características funcionales no permitían alcanzar elevaciones de la concentración de Ca^{2+} .

La toxicidad ejercida por glutamato descrita previamente en la línea celular PC12 no es mediada por los receptores ionotrópicos del neurotransmisor y los antagonistas específicos de estos receptores no ejercen efectos significativos sobre el grado de lisis celular inducida por el glutamato. La vitamina E sí es parcialmente efectiva en la reversión de la extensión de la muerte celular que producía el neurotransmisor, lo que apunta a un proceso de generación de radicales libres y estrés oxidativo como causa final de la muerte. En cultivos primarios inmaduros se ha descrito un efecto neurotóxico similar del glutamato no mediado por receptores. Estas células mueren a consecuencia de un estrés oxidativo desencadenado por el bloqueo competitivo que ejerce el glutamato del medio sobre el transporte de cistina a través de la membrana. La cistina es el precursor limitante en la síntesis de glutatión, al inhibirse la entrada de cistina los niveles de glutatión disminuyen y con ello las defensas naturales de la célula frente a especies oxidantes. Este sistema resulta útil para el estudio de forma aislada de un mecanismo de estrés oxidativo como ruta final conducente a la muerte en células nerviosas.

En este trabajo se utilizaron células de corteza e hipocampo que eran tratadas en su primer día *in vitro* con glutamato añadido al medio de cultivo y producía la degeneración de un 80% de las células al cabo de 24 horas de presencia crónica. Los receptores de glutamato están presentes en muy bajo nivel en los estadios tempranos de diferenciación y en estos cultivos se demostró farmacológicamente que no era ninguno de estos receptores el mediador del efecto tóxico mayoritario

ejercido por el glutamato. No obstante la coadministración de vitamina E con el glutamato bloqueaba totalmente la toxicidad de este último. La vitamina E actúa como antioxidante "rompedor de cadena ", pero no guarda relación con los niveles de glutatión, por lo que su acción protectora en los cultivos era ejercida contrarestando la acción de radicales libres en un proceso de estrés oxidativo.

La muerte celular por estrés oxidativo inducida en los cultivos inmaduros por glutamato podía evitarse inhibiendo la síntesis de proteínas con cicloheximida. Este resultado puede interpretarse como una prueba del requerimiento de proteínas específicas para llevar a cabo el proceso de muerte celular. El objetivo primordial del trabajo era la identificación de moléculas de este tipo cuya presencia sea un requisito común en distintos tipos de muerte neuronal y para ello (una vez establecida la necesidad de síntesis de novo de proteínas en la citotoxicidad de los cultivos; se analizó la expresión de genes inmediato temprano como posibles factores de transcripción. Los niveles de dos de este tipo de genes *c-fos* y *c-jun* aparecían aumentados como efecto de la aplicación de glutamato al medio de cultivo. Del mismo modo se observó un aumento en los niveles de expresión del gen *cox-2* y la presencia de estos niveles inducidos de su expresión al cabo de 16 horas de presencia crónica de glutamato en el medio. Los experimentos de supresión de traducción llevados a cabo mediante oligonucleótidos antisentido para *c-Fos* y *Cox-2*, mostraron que la supresión de *c-Fos* no tenía ningún efecto directo sobre la supervivencia de las células expuestas a glutamato, mientras que en el caso de *Cox-2* su supresión

confería una protección parcial frente a la muerte en los cultivos tratados.

La ineffectividad del oligonucleótido antisentido de *c-fos* en conferir protección frente a la toxicidad del glutamato podría interpretarse de distinto modo respecto a su implicación en el proceso de estrés oxidativo. Resulta interesante el hecho de que algunos factores de transcripción miembros de la superfamilia de factores de transcripción "cremallera de leucinas" a la que pertenece *c-Fos* están sometidos a una regulación redox. De forma que la unión del heterodímero Fos-Jun a la secuencia consenso que reconoce en el DNA depende de la reducción de residuo de cisteína estratégico en su dominio de unión a DNA. De hecho esta denominada "cistina activa" debe ser constantemente reducida por una enzima celular llamada Ref-1 que curiosamente se trata de una enzima de doble función y posee además una actividad reparadora de DNA. Ref-1 es responsable de la reparación del tipo de daño que producen los radicales libres en el DNA, como consecuencia de un estrés metabólico. Esta conexión junto con la existencia de sitios de unión AP-1 en promotores de genes implicados en regulación redox intracelular, sugiere que Fos podría controlar genes implicados en el estrés metabólico y sus consecuencias. Por tanto la inducción de *c-fos* y *c-jun* en cultivos inmaduros tras la exposición a glutamato podría intervenir en la transactivación de un mecanismo de defensa frente a una situación de estrés más que en la transactivación de genes efectores en el proceso de estrés oxidativo y la supresión de la traducción de *c-Fos* lejos de ejercer un efecto protector para las células podría incluso acelerar la muerte de las

células por estrés oxidativo al bloquearse la activación de algún mecanismo de defensa para contrarestarlo.

En contraste Cox-2 es un miembro de la familia de genes tempranos que no codifica para factores de transcripción. Este gen se expresa en el cerebro en poblaciones discretas particularmente en la corteza e hipocampo y está sometido a una rápida regulación. Cox-2 es la única forma de ciclooxigenasa inducible que se conoce, esta enzima es limitante en la síntesis de tromboxanos y prostaglandinas a partir de ácido araquidónico y posee dos actividades: como bisoxigenasa que media la formación de PGG_2 a partir de dos moléculas de oxígeno y una de araquidonato y como hidroperoxidasa que cataliza una reducción neta de dos electrones del grupo 15-hidroperoxyl de PGG_2 , para dar PGH_2 el precursor inmediato de PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 , prostaciclina y tromboxano A_2 . Los niveles de muchos de estos metabolitos del ácido araquidónico, se han visto aumentados drásticamente en numerosas patologías cerebrales aunque no se conocen los mecanismos de acción de la neurotoxicidad asociada a estas moléculas esta podría estar asociada a la expresión de Cox-2. La idea de que Cox-2 puede ser un mediador importante de daño (la muerte) neuronal está en concordancia con los resultados obtenidos con el oligonucleótido antisentido. La actividad enzimática de Cox genera radicales libres en forma de peróxidos lipídicos, que pueden contribuir a una mayor perturbación de la disminuida capacidad reductora de las células deplecionadas de glutatión. Esta enzima posee una corta vida media y es rápidamente inactivada rápidamente inactivada tras la conversión de PGG_2 a PGH_2 por lo que el

mantenimiento de la actividad enzimática requiere una constante expresión y síntesis de la proteína enzimática lo cual en los cultivos es posible que este ocurriendo hasta las 16 horas de exposición a glutamato.

Los datos obtenidos indican que la presencia crónica de glutamato en el medio de cultivo de células inmaduras de corteza e hipocampo durante 24 horas desencadena un proceso de estrés oxidativo que conduce a la muerte celular. Los cultivos inmaduros son prácticamente insensibles a NMDA, KA y AMPA y el efecto del glutamato externo es probablemente debido a su capacidad de bloqueo del transportador de cistina de alta afinidad en la membrana de estas células y la consiguiente depleción de glutatión intracelular, que conduce a la muerte celular. La carga oxidante en estas células se acumularía partir de radicales libres generados constitutivamente en la oxidación fosforilativa mitocondrial y es potenciada por la activación de otras de enzimas a lo largo del proceso. En la situación de estrés la pérdida de homeostasis general en la y las alteraciones en lípidos de membrana por el ataque de las especies oxidativas puede producir la entrada de Ca al interior celular permeando a través de a través de los VSSC (por depolarización), esta entrada de Ca^{2+} podría ocurrir también en pequeña medida a través de alguno de los receptores de glutámico activados (receptores de AMPA/KA). La activación Ca^{2+} de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) libera ácido araquidónico, que como sustrato de Cox cuya inducción ha sido asociada también con actividad sináptica. El Ca^{2+} puede activar otras potenciales enzimas oxidativas como la óxido nítrico sintetasa (NOS) que cataliza la formación de óxido nítrico (NO), un

mensajero difusible cuya implicación en la generación de radicales libres ha sido extensamente documentada.

Curiosamente se encuentra un enriquecimiento coincidente de NOS y COX-2 en algunas regiones anatómicas como el hipocampo, amígdala y capas superficiales de la corteza (Yamagata et al., 1993). Proteínas dependientes de Ca^{2+} pueden además convertir la enzima xantina dehidrogenasa en xantina oxidasa que cataliza la conversión de hipoxantina y xantina acumuladas, hasta ácido úrico por una nueva vía generadora de radicales de oxígeno.

La caracterización de los posibles genes inducidos por la presencia de glutamato en el medio de los cultivos inmaduros a partir de los clones aislados por hibridación substractiva en el laboratorio aportar información adicional respecto a los mecanismos moleculares que actúan en este proceso irreversible de muerte por estrés oxidativo.

CONCLUSIONES

La línea celular PC12 expresa receptores funcionales para NMDA. Estos receptores son heterómeros compuestos por las subunidades NMDAR1 y NMDAR2C.

La diferenciación de las células PC12 con NGF, aumenta los niveles de la proteína NMDAR1 aunque no hay cambios a nivel de la expresión de ARNm.

La exposición a concentraciones neurotóxicas de NMDA de las células PC12 no conduce a su muerte.

En cultivos inmaduros de neuronas de corteza e hipocampo el glutamato ejerce un efecto citotóxico no mediado por receptores ionotrópicos o metabotópicos.

La muerte inducida en cultivos inmaduros por el glutamato es debida a estrés oxidativo y la vitamina E puede revertir este efecto hasta las 10 horas después de la aplicación de glutamato.

El tratamiento con glutamato produce un aumento en la expresión de *c-fos* , *c-jun* y *cox-2* en estos cultivos.

El oligonucleótido antisentido de *cox-2* confiere protección parcial frente a la toxicidad del glutamato.

BIBLIOGRAFIA

-Bannai, S.(1986). Exchange of glutamate and cystine across plasma membranes of human fibroblasts.*J.Biol.Chem.***259**, 2435-2440.

-Casado, M., Lopez-Guajardo, A., Mellstrom, B., Naranjo, J.R., y Lerma, J.(1994). Endogenous NMDA receptors in PC12 cells show particular functional properties.*Society of Neuroscience Abstracts*.

-Chen, J., Marsh, T., Zhang, J.S., y Graham, S.(1995) Expression of cyclooxygenase 2 in rat brain following kainate treatment.*Neuroreport***6**, 245-248.

-Cho, Y., y Bannai, S.(1990). Uptake of glutamate and Cystine in C-6 Glioma Cells and in Cultured Astrocytes. *J.Neurochem.* **55**, 2091-2097.

-Ishii, T., Moriyoshi, K., Shugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M., y Nakanishi, S.(1993). Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-Aspartate receptor subunits. *J.Biol.Chem.***268**, 2836-2843.

-Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Bursnashev, N., y Seeburg, P. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distction of subtypes. *Science* **256**, 1217-1221.

-Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., y Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* **354**, 31-37.

-Murphy, T.H., y Baraban, J.M. (1990). Glutamate toxicity in immature cortical neurons precedes development of glutamate receptor currents. *Dev. Br. Res.* **57**, 146-150.

-Murphy, T.H., Schaar, R., Coyle, J.T., (1990) *FASEB J.* **4**, 1624

-Oka, A., Belliveau, M.J., Rosenberg, P.A., y Volpe, J.J. (1993). Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms and prevention. *J. Neurosci.* **13**(4), 1441-1453.

-Perry, T. L., Hansen, S., y Kennedy, J. (1975) CSF amino acids and plasma-CSF amino acid ratios in adults. *J. Neurochem.* **24**, 587-589

-Schubert, D., Kimura, H. y Maher, P. (1992). Growth factors and vitamin E modify neuronal glutamate toxicity. *PNAS* **89**, 8264-8267.

-Sucher, n.j., Brose, N., Dieitcher, D.L., Awobuluyi, M., Gasic, G.P., Bading, H., Cepko, C.L., Greenberg, M.E., Jahn, R., Heinemann, S.F. y Lipton, S.A. (1993). Expression of endogenous NMDAR1 transcripts without receptor protein suggests post-transcriptional control in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 22299-22304.

-Traystman, R.J., Kirsch, J.R., y Koehler, R.C. (1991). Oxygen free radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *Ann. J. Physiol.* **71**, 1185-1195.

-Traystman, R.J., Kirsch, J.R., y Koehler, R.C. (1991). Oxygen free radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *Ann. J. Physiol.* **71**, 1185-1195.

-Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W., Barnes, C., y Worley, P. (1993). Expression of a Mitogen-Inducible Cyclooxygenase in Brain Neurons: Regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* **11**, 371-386.

-Youkin, D.P., Tang, C.M., Hardy, M., Reddy, U.R., Shi, Q.Y., Pleasure, S.J., Lee, V.M.Y., y Pleasure, D. (1993). Inducible expression of neuronal glutamate receptor channels in the NT2 human cell line. *PNAS* **90**, 2174-2178.

-Zoukin, R.S., y Bennet, M.V.L. (1995). Alternative spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *TINS* **18**, 306-313.